

ÜBER DIE RADIOLYSE
VON DESOXYRIBONUCLEINSÄURE IN
GEGENWART VON SERUMALBUMIN

von

Albert Maria Geiger

aus

München

*Diss. Erlangen
1904*

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pauly

ÜBER DIE RADIOLYSE VON DESOXYRIBONUCLEINSÄURE IN GEGENWART VON SERUMALBUMIN

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Albert Maria Geiger

aus

München

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan	: Prof. Dr. F. Wolf
Referent	: Prof. Dr. H. Schüssler
Korreferent	: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.1984

Meinen
lieben Eltern
gewidmet

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
1. <u>Einleitung und Problemstellung</u>	1
2. <u>Experimenteller Teil</u>	5
2.1 Laborausstattung	5
2.1.1 Materialien	5
2.1.2 Geräte	6
2.2 Arbeitsmethoden	7
2.2.1 Bestrahlung	7
2.2.1.1 Herstellung der Proben	7
2.2.1.2 Versuchsanordnung	7
2.2.1.3 Gasbedingungen	9
2.2.1.4 Dosisleistung der Röntgenröhre	9
2.2.2 Gelfiltration	10
2.2.2.1 Versuchsanordnung	10
2.2.2.2 Vorbereitung des Gels	13
2.2.2.3 Packen der Säulen	14
2.2.2.4 Auftrennung der Proben	15
2.2.2.5 Maßnahmen gegen das Verstopfen der SDS-Säule	15
2.2.3 Auswertung der gelchromatographischen Auftrennungen	17
3. <u>Ergebnisteil</u>	20
3.1 Theoretische Grundlagen zum Verständnis der Ergebnisse	20
3.1.1 Strahlenchemie des Wassers	20
3.1.2 Wahl der Gasbedingungen	22
3.1.3 Einige Angaben zu den Modellsubstanzen	24
3.1.3.1 Zur Desoxyribonukleinsäure (DNA)	24

	Seite
3.1.3.1.1	Strukturen in vivo 24
3.1.3.1.2	Struktur und Konzentrationsverhältnis in vitro 26
3.1.3.2	Zum Rinderserumalbumin 26
3.1.4	Wirkungen von Natriumdodecylsulfat (SDS) 30
3.1.5	Prinzip der Gelfiltration 31
3.1.6	Struktur und Eigenschaften von Sepharose CL-2B 32
3.1.7	Grenzen der Meßgenauigkeit bei der Probenherstellung 32
3.2	Ergebnisse 34
3.2.1	Eichkurven für die Proteinbestimmungen 34
3.2.1.1	Proteinbestimmung nach Sedmak und Grossberg 34
3.2.1.2	Proteinbestimmung nach Wang 35
3.2.2	Auftrennungen nativer Proben 36
3.2.3	Veränderungen des Absorptionsverhaltens der Proben durch Röntgenstrahlen und SDS 39
3.2.4	Auftrennungen bestrahlter Proben von DNA ohne RSA 40
3.2.5	Auftrennungen unter N_2 bestrahlter Proben von DNA und RSA 41
3.2.6	Auftrennungen unter Luft bestrahlter Proben von DNA und RSA 48
3.2.7	Auftrennungen unter N_2O bestrahlter Proben von DNA und RSA 54
3.2.8	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse 61
4.	<u>Diskussion</u> 64
4.1	Zur Auftrennung unbestrahlter Proben 64
4.2	Zu den Veränderungen des Absorptions- verhaltens 65

	Seite
4.3	Zur Radiolyse der Modellsubstanzen 66
4.3.1	Zur Radiolyse der DNA 66
4.3.2	Zur Radiolyse des RSA 70
4.3.3	Zur gemeinsamen Radiolyse von DNA und RSA 72
4.3.3.1	Zu Nachweis und Art der DNA-RSA-Bindungen 72
4.3.3.2	Zum Bindungsmechanismus 73
5.	<u>Zusammenfassung</u> 79
6.	<u>Literaturverzeichnis</u> 81



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546217_0053

1. Einleitung und Problemstellung

Als Wilhelm Conrad Röntgen im Dezember 1895 nach mehrwöchiger intensiver Forschungsarbeit seine Mitteilung "über eine neue Art von Strahlen" veröffentlicht hatte, wurde ihr so- gleich größtes öffentliches Interesse zuteil (Glasser 1931). Für fast jedermann war ersichtlich, daß eine Entdeckung von ungeahnter Bedeutung für Wissenschaft und Technik gelungen war. Mit der ersten Aufnahme einer Hand hatte Röntgen der Medizin ein neues Gebiet der Diagnostik eröffnet, das erste Röntgenbild eines inhomogenen Metallstücks zeigte eine neue Möglichkeit zur Prüfung und Erforschung technischer Werkstof- fe auf.

Bald schon offenbarte der in der ersten Begeisterung allzu sorglose Umgang mit den X-Strahlen und den 1896 von Becquerel entdeckten natürlichen ionisierenden Strahlen, daß diese nicht, wie es anfangs schien, spurlos durch lebendes Gewebe hindurchgingen. Hautverbrennungen, Haarausfall, Strahlenka- ter und selbst tödliche Schädigungen waren keine Seltenheit. Die Erforschung dieser Erscheinungen wie auch der krebserzeu- genden und krebshelenden Wirkung der Strahlen begründete ei- nen neuen Wissenschaftszweig, die Strahlenbiologie. Entspre- chend der zunehmenden Belastung der menschlichen Umwelt mit ionisierender Strahlung durch Medizin, Kriegs- und Energie- technik, sowie Industrie, wuchs die Bedeutung dieser For- schungen bis heute stetig. Obgleich nun schon seit über 80 Jahren auf diesem Gebiet gearbeitet wird, und sowohl die physikalische Strahlenwirkung als auch zahlreiche biologi- sche Veränderungen an den verschiedenen Zellsystemen weitge- hend bekannt sind, liegt dazwischen eine ganze Kette von Vor- gängen chemischer Art fast völlig im Dunkeln.

Um dieses Dunkel aufzuhellen, ist man dazu übergegangen, bio-

chemisch bedeutsame Moleküle wie Nukleinsäuren und Proteine den ionisierenden Strahlen auszusetzen. Das konnte aber nur soweit geschehen, wie die Entwicklung der Trennverfahren eine Reindarstellung dieser Stoffe ermöglichte. Schon im vorigen Jahrhundert entwickelten Denis (1840) und Kander (1886) Reinigungsverfahren für Albumin und Miescher (1869) für die von ihm entdeckten Nukleinsäuren. Erst um 1960 gelang die Isolierung wichtiger Enzyme wie Ribonuklease, Laktatdehydrogenase und Trypsin. Seit den von Fricke (Fricke, Petersen 1927) geäußerten und von Dale (Dale 1942, 1947, Dale u. Gray 1949, Dale 1954) bestätigten Vermutungen über die Radiolysevorgänge im Wasser beim Bestrahlen wässriger Lösungen ist es notwendig, zwischen der direkten Strahlenwirkung auf Trockensubstanzen und der vorwiegend indirekten Strahlenwirkung auf gelöste Stoffe zu unterscheiden. Letzterer kommt besondere Bedeutung zu, da der Wassergehalt von Säugetierzellen bis zu 70 % beträgt.

Bei der Untersuchung der strahleninduzierten Schäden an Zellen lenkten Beobachtungen wie die, daß Organismen mit höherem DNA-Gehalt strahlenempfindlicher waren als solche mit niedrigerem (Kaplan, Moses 1964), schon bald die Aufmerksamkeit auf die DNA als Target für die Zellinaktivierung und die strahlenbedingte Carcinogenese. Das Hauptaugenmerk richtete sich dabei zunächst auf die Schäden an den Nukleinsäuremolekülen selbst, wie Strangbrüche und Basenveränderungen.

Erst gegen Ende der sechziger Jahre verlagerte sich das Interesse allmählich auf die Tatsache, daß die Nukleinsäuren nie isoliert vorkommen, sondern stets mit Protein auf das engste vergesellschaftet sind. In einem relativ kleinen Teil aller Veröffentlichungen, welche von strahleninduzierten Veränderungen an Nukleinsäuren handeln, wurde seither die Möglichkeit veränderter Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuren und Proteinen erörtert. Eine Zusammenstellung der bis 1975 dazu erschienenen Arbeiten gibt Yamamoto (1976). Es ließen sich

nach Einwirkung ionisierender Strahlen auf biologische Zellsysteme Quervernetzungen zwischen Nukleinsäuren und Proteinen nachweisen aufgrund:

- a) der veränderten Extrahierbarkeit der DNA,
- b) des Nachweises von Protein in der Nukleinsäurefraktion,
- c) der Sedimentationsanalyse,
- d) der Ergebnisse der Untersuchungen mittels Membranfiltertechnik,
- e) der Chromatographie über DNA-enhaltende Säulen.

Dabei ist daran zu denken, daß solche Quervernetzungen im Chromatin zwischen DNA und Desoxynukleoprotein (welches aus basischen Histonen und überwiegend saurem Nüchthistoprotein besteht) die fehlerlose Transkription oder Replikation verhindern. In den Ribosomen wäre eine Veränderung oder Hemmung der Proteinsynthese durch Vernetzungen zwischen RNA und Protein denkbar.

Auch in "in vitro"-Systemen wurde mit einem Teil der vorher aufgeführten Methoden die Verstärkung der Wechselwirkung nach Radiolyse gemessen. Dabei wurde auch schon an dem System, Rinderserumalbumin (RSA) und Desoxyribonucleinsäure (DNA), das auch in dieser Arbeit untersucht werden soll, mit Hilfe der Membranfiltertechnik festgestellt, daß es zu strahleninduzierten Wechselwirkungen zwischen Protein und Nukleinsäuren kommt (Minsky, Braun 1977). Dieses System hat mehrere Vorteile. Beide Komponenten sind hochgereinigt und zu erschwinglichen Preisen im Handel. Struktur und chemische Zusammensetzung sind weitgehend aufgeklärt. Auch über strahleninduzierte Veränderungen an beiden Komponenten liegen schon relativ viele Erkenntnisse vor.

Die genannten, an diesem System bereits durchgeführten Untersuchungen erlauben noch keine Aussage darüber, ob es sich bei den Wechselwirkungen in den Nukleinsäure-Protein-Addukten um kovalente oder nicht-kovalente Bindungen handelt. In

den meisten Fällen sind auch noch keine Angaben über die Menge des gebundenen Proteins in Abhängigkeit von der Dosis, vom Konzentrationsverhältnis Protein : Nukleinsäure oder von anderen Bestrahlungsbedingungen möglich.

In dieser Arbeit sollen nun bei konstantem Mischungsverhältnis DNA : RSA = 1 : 10, welches etwa dem natürlichen Verhältnis Nukleinsäuren : Protein in der Säugetierzelle entspricht, und bei neutralem pH die Dosis und die Gasbedingungen variiert werden. Es soll unter Sauerstoff, Stickstoff und Lachgas bestrahlt werden. Um festzustellen, wie weit kovalente bzw. nicht-kovalente Wechselwirkungen induziert werden, sollen zum Vergleich alle Bestrahlungen wiederholt und die Proben mit Dodecylsulfat versetzt werden, welches die hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Biomolekülen aufhebt. Schließlich soll die Eignung weitporiger Agarosegele zur Auftrennung der nativen und bestrahlten Gemische getestet werden.

2. Experimenteller Teil

2.1 Laboraausstattung

Zur Durchführung der Arbeit wurden folgende Materialien, Chemikalien und Geräte des Radiologischen Instituts der Universität Erlangen-Nürnberg verwendet.

2.1.1 Materialien

- Albumin aus Rinderserum¹⁾ (Lyophilisat); Boehringer, Mannheim,
- Desoxyribonucleinsäure²⁾ aus Kalbsthymus, Typ I; Sigma Chemie GmbH, München,
- Dodecylsulfat³⁾, Natriumsalz, kristallisiert, reinst; Serva, Heidelberg,
- Di-Natrium-hydrogenphosphat-12-hydrat; Merck, Darmstadt,
- Natrium-dihydrogenphosphat-1-hydrat; Merck, Darmstadt,
- Natriumazid; Merck, Darmstadt,
- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz; Merck, Darmstadt,
- Kupfer(II)-Sulfat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; Merck, Darmstadt,
- Triplex III zur Analyse (Äthylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz)⁴⁾; Merck, Darmstadt,
- Natriumcarbonat, wasserfrei, zur Analyse; Merck, Darmstadt,
- Natronlauge 1N; Merck, Darmstadt,
- Perchlorsäure 60 %; Merck, Darmstadt,
- Coomassie Brilliant Blue G 250; Serva, Heidelberg,
- Stickstoff, nachgereinigt; Linde AG, Nürnberg,
- Distickstoffmonoxyd; Linde AG, Nürnberg,
- Pyrogallol-Lösung 25 %; Merck, Darmstadt,
- Maranon; Henkel, Düsseldorf,
- RBS-50-Konzentrat; Carl Roth KG, Karlsruhe,
- Propanol-(1) 99 %; Merck, Darmstadt,
- Hostaphanfolie, 0,033 mm dick; Kalle, Wiesbaden-Biebrich,

- Parafilm; Laborcenter, Nürnberg,
- Teflonschlauch; Laborcenter, Nürnberg,
- Filtertuch, 20 μ m Maschenweite; Laborcenter, Nürnberg,
- Sepharose CL-2B; Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden,
- Entionisiertes keimfreies Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage.

2.1.2 Geräte

- Therapie-Röntgenröhre TR 300f; Siemens, Erlangen,
- Kälte Thermostat, Ultra Kryomat TK 30 D; Wobser, Lauda,
- Bestrahlungsgefäß und Chromatographierohre aus Plexiglas; nach Plan angefertigt von Herrn Lehmeier, Institut für Radiologie der Universität Erlangen,
- Spektralphotometer PMQ II; Carl Zeiss, Oberkochen,
- Spektrophotometer Modell 24; Beckman, Fullerton, USA,
- pH Meter 27; Radiometer, Kopenhagen,
- Quarzglas (Suprasil)-Küvetten, Schichtdicke 1 cm; Hellma, Mühlheim,
- Elektrische Magnetrührgeräte IKA-Combimag; Janke und Kunzel, Staufen,
- Ultrorac-Fraktionssammler LKB 7000; LKB Produkter, Bromma, Schweden,
- Colora Kühltruhe für Ultrorac LKB 7000; Colora Meßtechnik, Lorch (Württemberg),
- Calculator 9100 A; Hewlett Packard, Loveland, Colorado, USA,
- Analysenwaagen P1200, P120, B6, AC100; Mettler Zürich,
- Reagenzglasschüttler; B. Kummer, Freiburg i.Br.,
- Glassachen aus Jenaer Glas; Schott, Mainz,
- Finnpietten; Finnpiette KG, Helsinki,
- Pasteurpietten; Brand, Wertheim,
- Pipettierhilfe Dispensette; Brand, Wertheim,
- Wärmeschrank FTB 420; Heraeus, Hanau,
- Wasseraufbereitungsanlage; Karl Klein u. Sohn (KKS), Mannheim,
- Dampfsterilisator Vapoklav; Steriko, Dietikon, Schweiz.

2.2 Arbeitsmethoden

2.2.1 Bestrahlung

2.2.1.1 Herstellung der Proben

Es wurden jeweils 1 mg DNA und/oder 10 mg RSA in ein Probengefäß eingewogen und 10 ml eines 10^{-2} molaren Phosphatpuffers pH 7,0 dazupipettiert. Diese Ansätze blieben mit Parafilm abgedeckt mindestens zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehen. In dieser Zeit nahmen die DNA-Fasern Wasser auf und lösten sich. Anschließend wurden die Proben mit einem teflonbeschichteten Magnetrührer 15 Minuten lang so vorsichtig gerührt, daß eine mechanische Beschädigung der DNA nach Möglichkeit vermieden wurde. Dann konnte die Lösung in das Quarztöpfchen des Bestrahlungsgefäßes pipettiert werden, in dem sich ein kleiner Magnetrührer befand. Das Töpfchen wurde nach oben mit Hostaphanfolie und einem Spannring, die Probenentnahmeöffnung mit Parafilm verschlossen (Abb. 1). Durch gründliche Zwischenreinigung des Bestrahlungstöpfchens mit RBS, destilliertem Wasser und Puffer, durch Abwischen der Rührer mit 70 % Propanol und durch sofortiges Bedecken der Gefäße wurde versucht, alle Proben gleichermaßen rein und keimfrei zu erhalten.

2.2.1.2 Versuchsanordnung

Das Bestrahlungsgefäß wurde unter die Röhre auf ein Rührgerät gestellt. Die Röhre wurde heruntergefahren und auf das Gefäß aufgesetzt. Der Abstand zwischen dem Fokus der Röhre und dem Flüssigkeitsspiegel der Probe betrug 124 mm. Die zu durchstrahlende Flüssigkeitsschicht war bei einem Volumen von 10 ml 1 cm stark. Der 3 cm dicke Plexiglasboden des Bestrahlungsgefäßes schirmte die Rückstrahlung von den Metall-

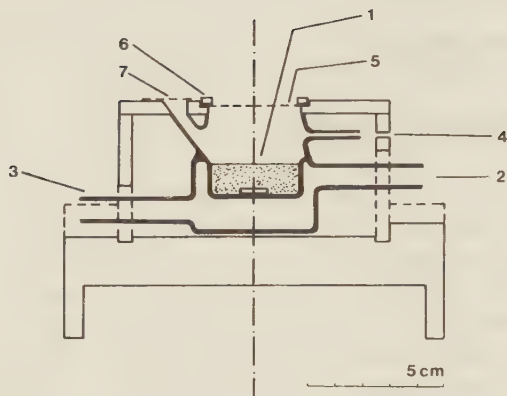


Abb. 1: Bestrahlungsgefäß für die Probenlösungen von Rinder-serumalbumin und Desoxyribonucleinsäure

1. Quarztopf
2. Kühlwasserableitung
3. Kühlwasserzuleitung
4. Gaszuleitung
5. Hostaphanfolie
6. Dichtungsring
7. Probenentnahmeöffnung

teilen des Rührgerätes ab. Im Kühlmantel des Bestrahlungs-töpfchens hielt ein Kryostat eine Temperatur von 4 °C aufrecht, einmal, um eine Erhitzung und thermische Veränderung der Probe während des Bestrahlungsvorganges zu verhindern und zum zweiten, um eine möglichst hohe, gleichbleibende Gas-sättigung zu erreichen.

2.2.1.3 Gasbedingungen

Es wurde unter drei verschiedenen Gasen bestrahlt, Luft, Stickstoff und Lachgas. Dabei kann im Zustand der Sättigung bei 5 °C und 760 Torr davon ausgegangen werden, daß in einem Liter Wasser oder wäßriger Lösung 0,03 Mol N₂O bzw. 0,002 Mol N₂ bzw. 0,0025 Mol O₂ aus der Luft enthalten sind.

Mit der Bestrahlung wurde immer erst begonnen, wenn die Probe mit dem jeweiligen Gas gesättigt war. Da der verwendete Puffer bereits ausreichend mit Sauerstoff aus der Luft angereichert war, genügte es bei denjenigen Proben, welche in Gegenwart von Sauerstoff bestrahlt werden sollten, 15 min vor dem Einschalten der Röhre die Kühlung in Gang zu setzen und durch Entfernen des Parafilms ein ausreichendes Nachströmen des Luftsauerstoffs zu ermöglichen. Zur Verdrängung des Luftsauerstoffs durch Stickstoff oder Lachgas war es nötig, diese Gase in gereinigter Form drei bzw. zwei Stunden lang vor Bestrahlungsbeginn und auch während des Bestrahlungszeitraums über die gerührten Proben zu leiten. Bei Stickstoff ließ sich ein Restsauerstoffgehalt von 0,7 % = $1,8 \cdot 10^{-5}$ M nicht vermeiden¹⁾. Um eine Verdunstung des Lösungsmittels im Gasstrom zu verhindern und um das Lachgas von eventuell enthaltenen Sauerstoffresten zu befreien, wurde der Stickstoff durch eine auf 4 °C gekühlte wassergefüllte Waschflasche und das Lachgas durch eine mit 25 % Pyrogallol-Lösung gefüllte Waschflasche geleitet.

2.2.1.4 Dosisleistung der Röntgenröhre

Alle Bestrahlungen wurden mit der Therapieröntgenröhre Sta-

1) Dankenswerterweise hat Frau Friedrich durch Sauerstoffmessungen mit der Sauerstoffsonde Modell 0260 von Beckman Instruments die nötigen Begasungszeiten und den Sauerstoffrestgehalt ermittelt.

bilipan TR 300f der Firma Siemens, Erlangen, durchgeführt. Die Röhrenspannung betrug 200 kV, der Röhrenstrom 20 mA. Die Röhre besaß eine Eigenfilterung von 2 mm Aluminium. Die Dosisleistung der Röhre wurde chemisch durch die Anwendung der Fricke-Dosimetrie ermittelt. Dabei werden Fe^{++} durch die Radio-lyseprodukte des Wassers zu Fe^{+++} oxidiert, welche entweder direkt photometrisch bei 304 nm bestimmt werden können oder auf dem Umweg über eine Farbreaktion mit Rhodanid bei 436 nm. Die indirekte Bestimmung ist 3,7 mal so empfindlich wie die direkte. Ausführliche Beschreibungen der Dosimetrie finden sich bei Kunigk (1971) und Zahn (1976). Für die verwendete Röntgenröhre wurde durch mehrfach wiederholte Messungen bei unerheblichen Schwankungen eine Dosisleistung von 29,3 Gy/min festgestellt¹⁾.

2.2.2 Gelfiltration

2.2.2.1 Versuchsanordnung

Die Auftrennung der bestrahlten Proben erfolgte über das Gel Sepharose CL-2B. Als Träger für das Gelbett dienten Plexiglasröhren mit Kühlmantel. Die Abb. 2 zeigt einen Längsschnitt durch das obere Verschlusssystem einer Leersäule; das untere war entsprechend gebaut. Wegen der besseren Darstellbarkeit der Konstruktionsdetails wurde nur ein Ausschnitt abgebildet.

Das Gelbett zwischen den Stopfen hatte eine Länge von 1070 mm, der Röhreninnendurchmesser betrug 25 mm. Daraus ergibt sich, daß dem Gel ein Volumen von 525 cm^3 zur Verfügung stand. Der Quotient - Länge des Gelbetts durch den Durchmesser desselben - betrug 42,8. Dieser Wert lag an der unteren Grenze des

1) Die Dosisbestimmung übernahm freundlicherweise Frau Dr. Schüßler; Institut für Radiologie der Universität Erlangen.

von Morris (1976) angegebenen Bereichs von 40 bis 100.

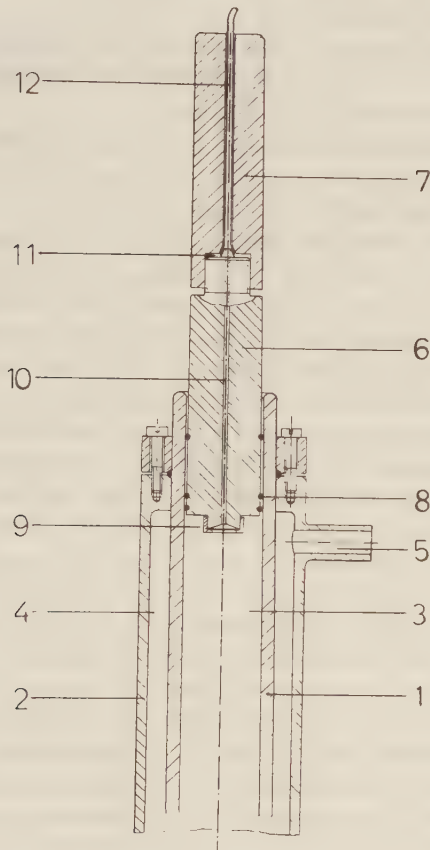


Abb. 2: Chromatographiesäulenendstück mit Verschußsystem
im Längsschnitt

1. Inneres Plexiglasrohr

2. Äußeres Plexiglasrohr

3. Raum für das Gel
4. Raum für das Kühlwasser
5. Kühlwasserabfluß
6. Patrizenteil des Stopfens aus Trovidur Hartplastik
7. Matrizenteil des Stopfens aus Trovidur Hartplastik
8. Dichtungsring aus Gummi
9. Abschlußfilter mit 20 μ m Maschenweite
10. Durchflußkanal
11. Schlauchabdichtung
12. Schlauchzuführung aus Teflon mit 1 mm $\emptyset$

Der Durchfluß wurde allein durch den hydrostatischen Druck zwischen dem Spiegel des Pufferreservoirs und dem Ausfluß am Tropfenzähler gewährleistet.

Um ein Trockenlaufen des Gels während der Nacht oder an Wochenenden zu verhindern, was ein Neupacken der Säule mit all den damit verbundenen Verschiebungen in der Auftrennung bedeutet hätte, wurde nach etwa der Hälfte der Versuche eine sogenannte Sicherheitsschleife eingeführt. Diese bestand darin, daß der Zuflußschlauch so lange gelassen wurde, daß er in einer Schleife bis unter das Niveau des Ausflusses herunterhing. Ging nun der Flüssigkeitsvorrat zur Neige, so konnte der Pufferspiegel nur bis zur Ausflußhöhe im absteigenden Teil der Schleife absinken. Der Siphon, der aufsteigende Schlauch und schließlich die Säule blieben mit Puffer gefüllt. An einer Stelle, etwa 30 cm vom oberen Stopfen entfernt, war der Schlauch trennbar, um zum Auftragen der Proben einen möglichst kurzen Zufluß zu bekommen und so unerwünschte Verdünnungsvorgänge auszuschließen.

Der Ausflußschlauch mündete in den Tropfenzähler. Dieser bestand aus einem Tropfenformer, der für eine möglichst große Volumengleichheit aller Tropfen sorgte, und einer Photozelle, welche mit einem Zählwerk verbunden war. Die Fraktionsgröße betrug bei allen Versuchen 3 ml. Das entsprach 49 Tropfen Phosphatpuffer. Bei der Verwendung von SDS wurde die Oberflächenspannung des Puffers geringer, wodurch eine Tropfen-

verkleinerung eintrat. Es waren nun für eine Fraktion 99 Tropfen nötig.

2.2.2.2 Vorbereitung des Gels

Das Gel wurde in gequollenem Zustand als dickflüssige Suspension vom Hersteller geliefert. Bei der Vorbereitung des Gels kamen die Anweisungen einer Firmenschrift (1980) des Herstellers und die am Institut in langjähriger gelchromatographischer Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Anwendung.

Die Gelsuspension wurde auf zwei Literflaschen verteilt und mit autoklaviertem, entgastem, $2 \cdot 10^{-2}$ M Phosphatpuffer im Verhältnis 1 : 1 verdünnt. Im Puffer war Natriumazid in einer Konzentration von 0,02 % gelöst, um einer Keimbesiedlung des Gels vorzubeugen. Beide Flaschen wurden nun, da der Hersteller vor der Verwendung von Magnetrührern gewarnt hatte, auf ein Schüttelgerät gespannt und der Inhalt gründlich durchgemischt.

Um Gelbruchstücke und sonstige feine Verunreinigungen, die häufig zum Verstopfen der Filter führen, entfernen zu können, ließ man das Gel 15 Minuten sich absetzen. Anschließend wurde der Pufferüberstand mit einer Wassertrahlpumpe abgesaugt. Diese Reinigung wurde noch zweimal wiederholt. Die Tatsache, daß im Überstand nie irgendwelche Trübungen oder einzelne Schwebeteilchen beobachtet werden konnten, scheint aber darauf hinzudeuten, daß die Gele heute so homogen und so gereinigt verkauft werden, daß diese Waschungen eigentlich nicht mehr nötig wären.

Daraufhin wurde das Gel abermals verdünnt, im Wasserbad auf ca. 30 °C erwärmt und auf dem Schüttelgerät mit einer Wasserstrahlpumpe vollständig entgast. Das Erwärmen und Schütteln

beschleunigte den Entgasungsprozeß erheblich. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur war das Gel zum Packen der Säulen hergerichtet.

2.2.2.3 Packen der Säulen

Zuerst wurden die Plexiglasröhren, die Verschlußstopfen und die Teflonschläuche mit zweiprozentiger Maranonlösung gefüllt. Nach 24 Stunden wurde die Maranonlösung entfernt und die Säulen mit destilliertem Wasser und $2 \cdot 10^{-2}$ M Phosphatpuffer mit pH 7 nachgespült. Die vollständige Entfernung des alkalischen Maranons konnte mit pH-Papier kontrolliert werden.

Das Packen der beiden Säulen erfolgte nun nacheinander. Die Abflußschläuche wurden abgeklemmt, die Gelrohre oben geöffnet, ein Kunststofftrichter darauf befestigt und 15 cm hoch entgaster Puffer eingefüllt. Jetzt ließ sich über den Trichter das verdünnte Gel blasenfrei eingießen, wenn man nur darauf achtete, daß es nicht hineinstürzte, sondern unter Wandkontakt hineinlief. Der Trichter wurde als Gelreservoir ebenfalls aufgefüllt und mit Alufolie abgedeckt. Nun erhielten die Gelkörner Zeit, sich abzusetzen. Der sich bildende Pufferüberstand wurde von Zeit zu Zeit abgehoben und durch Gelsuspension ersetzt. Sobald das Gel vollständig abgesunken war, wurde der Abflußschlauch geöffnet und die Säule mit einem Gefälle von 40 cm - gemäß dem vorgeschriebenen Betriebsdruck - nachgespült, bis sich das Gel auch unter Druck nicht mehr setzte. Dann konnte der Trichter entfernt und der obere Stempel aufgesteckt werden. Die geschlossenen Säulen wurden noch einmal mit dem dreifachen Eigenvolumen gespült, wobei der Puffer für die SDS-Säule mit 0,5 % SDS versetzt wurde. Schließlich mußte noch die SDS-freie Säule an den Kühlwasserumlauf angeschlossen werden, um zusätzlich ein mögliches Bakterienwachstum im Gel zu verhindern. In Gegenwart

von SDS konnte nicht gekühlt werden, weil dieses sonst ausgefallen wäre.

2.2.2.4 Auftrennung der Proben

Nach dem Bestrahlen wurden die Proben, die zur Auftrennung unter SDS vorgesehen waren, mit 1 % SDS versetzt, 5 Minuten im Wärmeschrank bei einer Temperatur von 100 °C inkubiert und wieder auf Zimmertemperatur gebracht. Damit sollte eine vollständige Entfaltung der bestrahlten Substanzen erzielt werden. Die übrigen Proben wurden unverändert auf die Säule aufgetragen.

Dazu wurde zunächst der Zuflußschlauch etwa 10 cm vor und hinter der Kopplungsstelle abgeklemmt, getrennt und das zur Säule führende Ende nach Desinfektion in das Probengefäß getaucht und mit Klebeband fixiert. Mit dem Öffnen der Klemmen und dem gleichzeitigen Einschalten des Fraktionssammlers startete der Auftrennungsvorgang. Sobald die Probe vollständig eingelaufen war, wurde nochmals kurz abgeklemmt und die Verbindung zum Pufferreservoir luftblasenfrei wiederhergestellt. Es mußten pro Versuch etwa 180 Fraktionen gesammelt werden, um alle Komponenten einer Probe zu erfassen. Gingen Bestrahlungsprodukte Wechselwirkungen mit dem Gel ein, so konnten diese nur durch längeres Zwischenspülen allmählich entfernt werden, ohne freilich noch ein verwertbares Konzentrationsmuster zu ergeben. Es fand sich einfach eine mehr oder weniger erhöhte Grundlinie.

2.2.2.5 Maßnahmen gegen das Verstopfen der SDS-Säule

Nach etwa 12 Trennungen auf der SDS-Säule traten unerwartete Schwierigkeiten auf. Die Durchflußgeschwindigkeit, die zu

Anfang 9 Sekunden pro Tropfen betragen hatte, verlangsamte sich innerhalb weniger Versuche auf 25 Sekunden je Tropfen, was die Gesamtdauer eines Versuchs auf 140 Stunden, also knapp sechs Tage ausdehnte. Weder die Ursache dieses Verstopfungsvorgangs noch seine Lokalisation am Gelbett konnte je ganz geklärt werden. Auch das Trennverhalten blieb davon nicht unberührt. Sicher bestand ein Zusammenhang zwischen dem Verstopfen und der Verwendung von SDS, da dieses Phänomen bei der anderen Säule nicht auftrat.

Anfangs wurden Verunreinigungen in den Filtern als Ursache angenommen und dieselben mehrmals erneuert. Die Verbesserung der Durchflußrate hielt nicht lange an. Danach sollten Zwischenspülungen entgegen der Flußrichtung eine etwaige Gelverdichtung am unteren Filter auflösen. Die anschließende Beschleunigung war sehr kurzzeitig. Später wurde die Säule neu gepackt und offen betrieben, damit das Gel eventuellen Quellvorgängen aufgrund von SDS nachgeben konnte. Der offene Betrieb geschah folgendermaßen: Der obere Stempel wurde zum Auftragen der Proben entfernt, der Puffer abgelassen, bis die Geloberfläche freilag, und die Probe daraufpipettiert. Sobald diese eingesickert war, wurde das Gel wieder mit Puffer überschichtet und der Stempel mit dem Zufluß wieder aufgesetzt. Damit konnte die ursprüngliche Durchflußgeschwindigkeit wiedergewonnen und länger erhalten werden als bei den vorausgegangenen Maßnahmen. Ein dauerhafter Erfolg blieb aber versagt.

Schließlich wurde die Säule mit einem neuen Gel gepackt, geschlossen betrieben und jeweils nach 3 bis 4 Läufen gewendet. Durch dieses Vorgehen ließ sich ein Verstopfen noch am längsten hinauszögern. Am Grundproblem änderte sich freilich auch jetzt nichts.

2.2.3 Auswertung der gelchromatographischen Auftrennungen

Die gesammelten Fraktionen blieben bis zum Ende der Auftrennung in der Kühltruhe bei 4 °C bzw. auf dem Fraktionssammler, sofern sie SDS enthielten. Dann wurden sie herausgenommen, abgedeckt und stehengelassen, bis sie Zimmertemperatur erreicht hatten, weil sonst das ständige Anlaufen der Küvetten den Meßvorgang behindert hätte. Die photometrische Ausmessung erfolgte gegen den Elutionspuffer als Leerwert in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke bei einem Spalt von 0,1 mm und bei 260 nm, da bei dieser Wellenlänge das Extinktionsmaximum der DNA liegt. Bei 260 nm absorbiert auch RSA, dessen Extinktionsmaximum bei 279 nm liegt, so daß die gemessenen Extinktionswerte nicht immer nur durch den DNA-Gehalt einer Fraktion bedingt sind. Die in der Literatur beschriebenen Färbeverfahren für DNA erwiesen sich als so wenig empfindlich, daß trotz der fehlenden Spezifität die Ausmessung bei 260 nm vorgezogen werden mußte.

Günstiger lag der Fall beim Albumin, da es Bestimmungen gibt, welche eine empfindliche Messung des RSA-Gehalts ermöglichen und für Protein spezifisch waren. Mit Hilfe von Eichgeräten konnte aus den Extinktionswerten auf den Proteingehalt der Fraktionen geschlossen werden. Es kamen zwei kolorimetrische Bestimmungsmethoden zur Anwendung. Bei den Versuchen mit SDS wurde die Bestimmung nach Wang (1975) durchgeführt, bei den übrigen die Färbung nach Sedmak und Grossberg (1977). Für jede Bestimmung waren besondere Reagenzien nötig. Bei jedem Versuch wurde zuerst die direkte Messung bei 260 nm vorgenommen und je nach Erfordernis jede bis jede fünfte Fraktion bestimmt.

Aus diesen Werten ließen sich Elutionsdiagramme erstellen, wobei die Extinktionen auf der Ordinate und die Fraktionen auf der Abszisse aufgetragen wurden. Da nun das Protein

- wie schon erwähnt - ebenfalls bei 260 nm leicht absorbiert, ließen sich aus diesen Diagrammen auch die Fraktionen, welche Albumin enthielten, abschätzen. Im Bereich der Proteingipfel wurde dann jede zweite und sonst jede fünfte bis zehnte Fraktion zur Farbbestimmung ausgesondert.

Für das Färbeverfahren nach Wang waren drei verschiedene Reagenzien A, B und C notwendig. Das Präparat A bestand aus Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, welches 1 : 1 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Zur Herstellung des Reagenz B wurden zunächst 21,3 mg EDTA und 14,3 mg Kupfersulfat in 50 ml Wasser gelöst. Dazu mußten 10 ml einer 20 %igen Natriumkarbonatlösung und 10 ml 1 N Natronlauge gegeben werden. Anschließend wurde mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und gründlich gerührt. Das Reagenz C bestand aus einer 10 %igen SDS-Lösung.

Das Herstellen der Probeansätze geschah folgendermaßen. Zu 600 µl Eluat bzw. Phosphatpuffer für den Leerwert wurde zunächst 1 ml Reagenz B pipettiert. Nach Schütteln und 15 Minuten Wartezeit wurden 600 µl Reagenz C und 100 µl Reagenz A zugegeben, die Proben nochmals geschüttelt und eine halbe Stunde stehen gelassen. Schließlich wurden sie bei einer Wellenlänge von 500 nm photometrisch ausgemessen.

Für die Proteinbestimmung nach Sedmak und Grossberg war nur ein einziges Reagenz nötig. Zur Herstellung desselben wurden 150 mg Coomassie Blau G in 250 ml 3 %iger HClO_4 gelöst und die Lösung abfiltriert. Dazu mußte die Extinktion des Filtrats bei 465 nm bestimmt werden. Falls diese nicht im Bereich von 1,3 bis 1,5 lag, wurde mit 3 %iger HClO_4 verdünnt.

Bei dieser Proteinbestimmung wurde folgendermaßen verfahren: 0,5 ml der jeweiligen Fraktion wurden mit 0,8 ml $2 \cdot 10^{-2}$ M Phosphatpuffer verdünnt, mit 1,3 ml Coomassie-Reagenz ver-

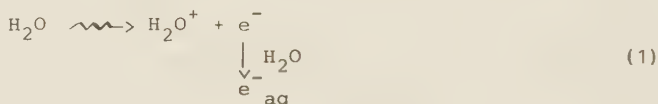
setzt und geschüttelt. Als Leeransätze wurden 1,3 ml Puffer und 1,3 ml Reagenz genommen. Die Proben mußten bei einer Wellenlänge von 620 nm innerhalb von 90 Minuten ausgemessen werden, da die Stabilität der Farbe begrenzt war.

3. Ergebnisteil

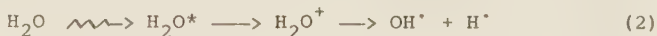
3.1 Theoretische Grundlagen zum Verständnis der Ergebnisse

3.1.1 Strahlenchemie des Wassers

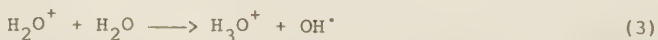
Wie schon in der Einleitung erwähnt, findet bei einer wäßrigen Lösung die hauptsächliche Wechselwirkung der Strahlung mit dem Wasser statt, wobei reaktive Teilchen entstehen, die dann mit den gelösten Substanzen weiterreagieren. Man kennt heute zwei Primärprozesse der Wasserradiolyse. Bei dem ersten handelt es sich um die Ionisation des H_2O -Moleküls, wobei ein Elektron entsteht, das innerhalb von 10^{-11} Sekunden eine Wasserhülle um sich aufbaut und als hydratisiertes Elektron nachgewiesen werden kann (Hart u. Boag, 1962; Keene, 1963).



Bei dem zweiten Prozeß wird durch die Strahlung ein H_2O -Molekül angeregt, das in zwei Radikale zerfällt.



Das in Gleichung 1 angegebene H_2O^+ -Ion ist chemisch nicht nachweisbar. Es wird angenommen, daß es nach 10^{-14} Sekunden folgendermaßen weiterreagiert.



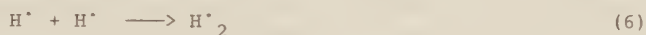
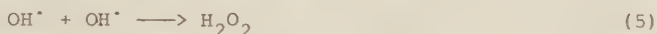
Auch das hydratisierte Elektron reagiert weiter, wenn auch

mit sehr kleiner, seine Lebenszeit begrenzender Geschwindigkeit.



Seine Halbwertszeit beträgt in sehr reinem Wasser 600 μs , sein pK-Wert liegt bei 9,7.

Die Primärprodukte der Wasserradiolyse können folgende molekulare Zersetzungsprodukte des Wassers bilden.



Bei der in dieser Arbeit verwendeten 200 kV Röntgenstrahlung mit einem niedrigen LET¹⁾ ist die Ausbeute an H_2O_2 und H_2 allerdings gering.

Durch Zugabe von Substanzen, welche nur mit einem Radikal reagieren, ließen sich diese Primärprodukte quantitativ bestimmen und folgende G-Werte²⁾ für pH 7,0 und Strahlen mit niedrigem LET ermitteln (J.G. Draganic, Z.D. Draganic 1971).

$$G(e^-_{aq}) = 2,65 \quad G(H^\bullet) = 0,58 \quad G(OH^\bullet) = 2,70$$

$$G(H_2) = 0,45 \quad G(H_2O_2) = 0,70$$

Die Wirkungen der Radikale auf die gelösten Stoffe sind verschieden. Das solvatisierte Elektron wirkt reduzierend auf

1) LET = linear energy transfer

2) G-Wert = $\frac{\text{Zahl der gebildeten (oder verbrauchten) Moleküle} \cdot 100}{\text{absorbierte Strahlenenergie in eV}}$

Gruppen hoher Elektronenaffinität. An Aliphaten reagiert es sehr schnell mit folgenden Gruppen:



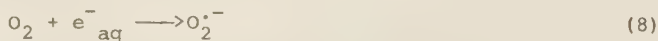
Mit Aromaten reagiert es nur, wenn durch Substitution eine elektrophile Gruppierung entsteht.

Das $\text{H}^\bullet$ -Radikal, das in neutraler Lösung nur in geringer Ausbeute anfällt, kann ebenfalls reduzierend wirken. Im Gegensatz zum solvatisierten Elektron kann sich das $\text{H}^\bullet$ -Radikal an Doppelbindungen anlagern. Außerdem ist es in der Lage, einem Molekül ein H-Atom zu entreißen, wobei tertiäre H-Atome schneller reagieren als sekundäre und primäre. Bei dieser Reaktion entsteht Wasserstoff.

Das $\text{OH}^\bullet$ -Radikal kann als elektrophiles Reagenz oxidierend wirken und reagiert an Stellen hoher Elektronendichte. Es lagert sich an Doppelbindungen in Aliphaten und Aromaten an und kann von chemischen Verbindungen H-Atome abspalten, wobei solche bevorzugt werden, welche an C-Atomen sitzen, die funktionelle Gruppen tragen.

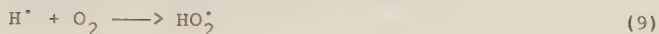
3.1.2 Wahl der Gasbedingungen

Auch zwischen den Radikalen und gelösten Gasen kann es zu Reaktionen kommen, die teilweise so schnell verlaufen, daß diese Gase als Abfangsubstanzen (= scavenger) wirken. So reagieren solvatisierte Elektronen und Sauerstoff mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k = 1,9 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

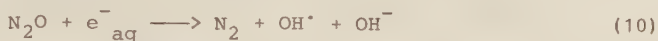


Das $\text{H}^\bullet$ -Radikal reagiert mit O_2 nach Gleichung (9) mit

$$k = 2 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1};$$



Bringt man Lachgas in Lösung, findet eine Reaktion mit dem solvatisierten Elektron statt. Die Geschwindigkeitskonstante beträgt dabei $8,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.



In diesem Fall werden nicht nur die reduzierenden Elektronen abgefangen, sondern es werden auch zusätzliche $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikale gebildet, was eine Verstärkung der durch $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikale bedingten Wirkungen erwarten läßt. Reaktionen zwischen N_2O und $\text{H}^{\bullet}$ -Radikalen sind zwar auch möglich, aber wegen der geringen Reaktionsgeschwindigkeit ($k = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und der geringen $\text{H}^{\bullet}$ -Radikalenzahl ohne Bedeutung.

Um die Wechselwirkungen aller entstehenden Radikale mit den gelösten Substanzen untersuchen zu können, ist es nötig, den Luftsauerstoff durch ein reaktionsträges Gas zu verdrängen. Dazu eignet sich gereinigter Stickstoff.

An dieser Stelle bedarf es noch einer Anmerkung zu der Möglichkeit von Reaktionen zwischen den Radikalen und den Pufferphosphatgruppen. Das $\text{H}^{\bullet}$ - und das $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikal reagieren mit dem Phosphat viel langsamer ($k < 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) als mit dem RSA und können diesbezüglich vernachlässigt werden. Die Reaktionskonstante des solvatisierten Elektrons mit Phosphat ist mit $4,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ kleiner als die Konstanten der Reaktionen mit Sauerstoff oder Lachgas, weshalb der Reaktion unter diesen Gasbedingungen ebenfalls keine Bedeutung zukommt. In Anwesenheit von Stickstoff jedoch stehen RSA und Phosphat in Konkurrenz um das Elektron. Die Wahrscheinlichkeit der Reaktion mit RSA errechnet sich dabei nach folgender Gleichung:

$$\begin{aligned}
 W_{e_{aq}^-} + RSA &= \frac{k_{e_{aq}^-} + RSA \cdot [RSA]}{k_{e_{aq}^-} + RSA \cdot [RSA] + k_{e_{aq}^-} + PO_4 \cdot [H_2PO_4]} = \quad (11) \\
 &= \frac{6,5 \cdot 10^9 \cdot 1,5 \cdot 10^{-5}}{1,5 \cdot 10^{-5} \cdot 6,5 \cdot 10^9 + 4,2 \cdot 10^6 \cdot 5 \cdot 10^{-3}} = \\
 &= 0,82
 \end{aligned}$$

Daraus ergibt sich, daß 82 % der Elektronen mit Protein, die restlichen 18 % dagegen mit Phosphatpuffer reagieren. Dabei entstehen $H^\bullet$ -Radikale nach der Gleichung:



3.1.3 Einige Angaben zu den Modellsubstanzen

3.1.3.1 Zur Desoxyribonukleinsäure (DNA)

3.1.3.1.1 Strukturen in vivo

Bei den DNA-Molekülen handelt es sich um Polynukleotide, deren Bausteine Phosphat, 2-Desoxyribose und die Purin- bzw. Pyrimidinbasen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) sind. Ihre Sekundärstruktur läßt sich am besten durch das von Watson und Crick konstruierte Raummodell (Abb. 3) beschreiben, welches einer gewundenen Stickleiter ähnelt. Die Phosphat- und die 2-Desoxyribosereste, welche durch 3,5-Phosphodiesterbindungen verknüpft und gegenläufig angeordnet sind, bilden die tragenden Stränge der Strickleiter. An den C_1 -Atomen der Zuckerreste sind die komplementären Basen A-T und G-C kovalent gebunden und entsprechen den Leitersprossen. Die Basenpaare selbst werden durch H-Brücken zu-

sammengehalten. Ihre Sequenz ist aperiodisch und beinhaltet die Information der Doppelhelix.

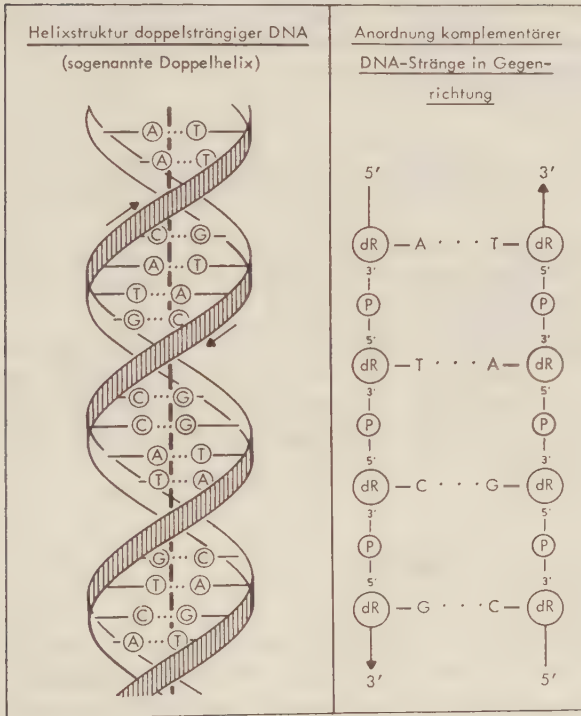


Abb. 3: Aufbau der DNA-Doppelhelix (Buddecke 1977)

Die Doppelhelix bildet nun ihrerseits zusammen mit Histonprotein die Struktur einer "Perlschnur". Die "Perlen", welche von der DNA regelrecht umwickelt werden, bestehen aus Histonproteinkomplexen mit alternierender Polarität. Liegt diese "Perlenschnur" in gewundenem Zustand vor, wird sie als Superhelix bezeichnet. Ist diese schließlich noch einmal spiralisiert, spricht man von der DNA-Super-Super-Helix. Diese drei Ordnungsstufen der DNA werden heute als Modell der Chromatinstruktur angenommen (Abb. 4).

3.1.3.1.2 Struktur und Konzentrationsverhältnis in vitro

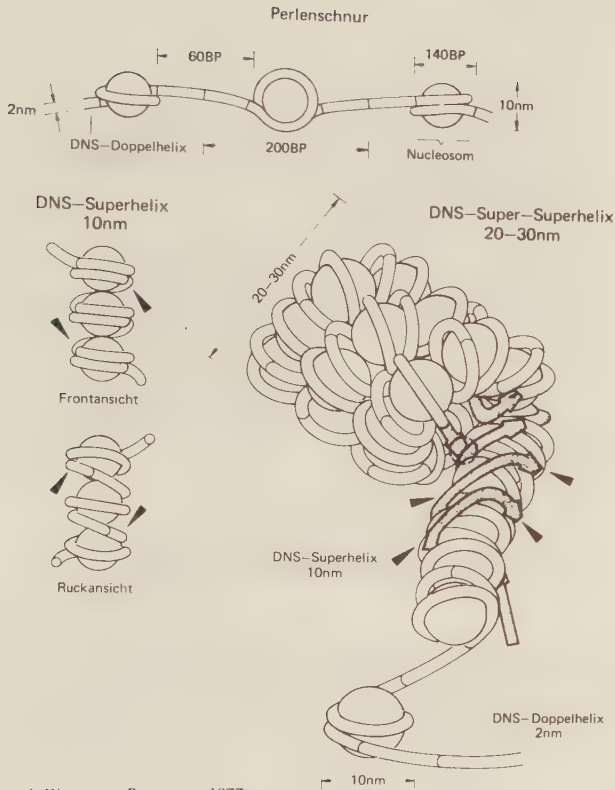
Die in dieser Arbeit verwendete DNA war von Protein gereinigt und lag als Doppelhelix vor. Das Molekulargewicht lag in einem Bereich von 12 bis $20 \cdot 10^6$.

Das durchschnittliche Molekulargewicht für ein Nukleotid beträgt etwa 300. Das heißt, bei einer Einwaage von 1 mg DNA in 10 ml ist die Molarität bezogen auf die Nukleotideinheiten $3,3 \cdot 10^{-4}$ M, während sie bezogen auf das gesamte DNAMolekül nur 5 bis $8 \cdot 10^{-9}$ ist.

3.1.3.2 Zum Rinderserumalbumin

Die Aminosäuresequenz des RSA (Rosenoer, Oratz, Rothschild 1977) ist bis auf die Aminosäuren 400 bis 403 vollständig aufgeklärt. Sie umfaßt 581 Aminosäuren (vgl. menschliches Serumalbumin 584 Reste).

Die Aminosäurezusammensetzung sieht folgendermaßen aus, wobei die ungeklärten Reste an menschliches Serumalbumin angeglichen wurden.



(nach WORCEL u. BENYAJALI, 1977)

Abb. 4: Modell der Chromatinstruktur (Aus Jungermann, Möhler 1980)

Asparaginsäure	43
Asparagin	10
Threonin	34
Serin	28
Glutaminsäure	63
Glutamin	15
Prolin	28
Glycin	15
Alanin	46
Cystin/2	34
Cystein	1
Valin	36
Methionin	4
Isoleucin	14
Leucin	61
Tyrosin	19
Phenylalanin	26
Histidin	17
Lysin	59
Arginin	23
Tryptophan	2

Das Übergewicht von 357 polaren Aminosäureseitenketten gegenüber 190 hydrophoben bewirkt den hydrophilen Charakter des Gesamtmoleküls. Durch den negativen Ladungsüberschuß der Glutaminsäure- und Asparaginsäurereste beträgt die Nettoladung bei pH 7 -18. Auf die Tatsache gestützt, daß benachbarte Cysteinreste wegen der Starrheit der Peptidbindung keine Disulfidbrücken bilden können, und diese nur zusammen mit einem isolierten Cysteinrest oder zwischen zwei isolierten Cysteinresten möglich sind, entwickelte Brown ein Schleifenmodell für die Primärstruktur des RSA (Abb. 5). Was die Sekundärstruktur angeht, so werden zu 50 % bis 55 % α -helikale und zu 15 % β -gefaltete Anteile angenommen; der Rest wird als Zufallsknäuel (random coil) beschrieben (Rosenoer, Oratz, Rothschild 1977). Bei einem errechneten Molekulargewicht von

66210 Daltons und einer Einwaage von 10 mg RSA in 10 ml betrug die Molarität bei unseren Versuchen $1,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l.

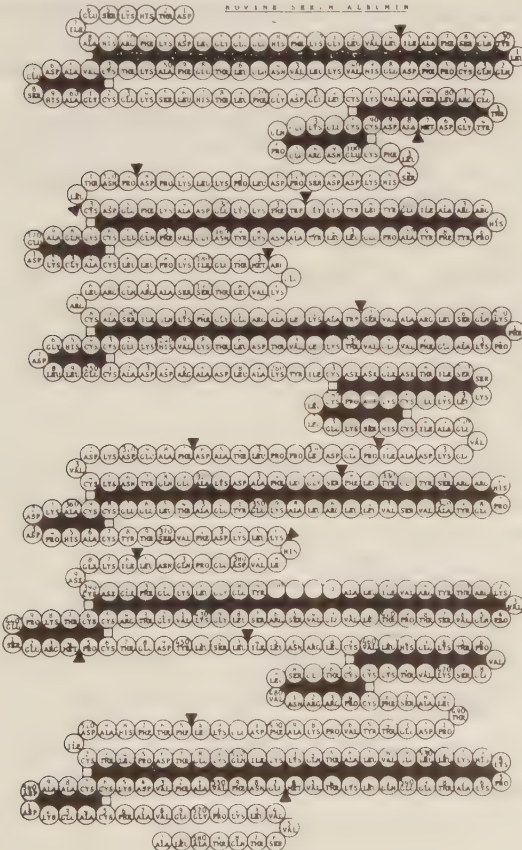


Abb. 5: Aminosäuresequenz und Schleifenmodell des RSA-Moleküls nach Brown (aus Rosenoer et al. 1977)

3.1.4 Wirkungen von Natriumdodecylsulfat (SDS)

SDS ($C_{12}H_{25}OSO_3 \cdot Na$) gehört zur Gruppe der Detergentien. Seine Moleküle bestehen aus langen apolaren, hydrophoben Kohlenwasserstoffketten, an deren Enden negativ geladene dissoziierbare Gruppen ($-CH_2-O-S(=O)_2-O^-$) sitzen. Durch Wechselwirkungen mit gelösten organischen Makromolekülen sind die SDS-Moleküle in der Lage, deren hydrophobe und elektrostatische inter- wie auch intramolekulare Bindungen aufzuheben.

Beim RSA bewirkt die Zugabe von SDS in Verbindung mit kurzzeitiger Erwärmung eine Entfaltung der Ketten, soweit es die 17 kovalenten Disulfidbrücken zulassen. Jedes Gramm RSA wird mit 0,9 g SDS beladen, wobei sich etwa 207 SDS-Moleküle an ein RSA-Molekül anlagern (Weber, Osborn, 1975; Griffith, 1972; Fish et al. 1970).

Über die Wirkung von SDS auf die DNA liegen keine sicheren Erkenntnisse vor. Die Beobachtung, daß es nach Zugabe von SDS zu einer DNA-Lösung zu einem Extinktionsanstieg bei 260 nm kommt, spricht dafür, daß die Doppelhelixstruktur durch SDS etwas aufgelockert wird und so die für die Extinktion hauptsächlich verantwortlichen Basen besser hervortreten. Schmelzkurven in Gegenwart von SDS zeigen andererseits, daß die komplementären Stränge durch SDS nicht getrennt werden (Schüller, 1982).

Für das Arbeitsmodell DNA/RSA kann man davon ausgehen, daß durch SDS alle eventuellen strahleninduzierten, nicht-kovalenten Bindungen zwischen beiden Substanzen und alle Wechselwirkungen mit dem Gel aufgehoben werden.

3.1.5 Prinzip der Gelfiltration

Die Gelfiltration, auch Gelchromatographie genannt, ist ein Trennverfahren, das mit zwei flüssigen Phasen arbeitet. Die stationäre Phase wird von dem in die Gelpartikel eingedrun- genen Lösungsmittel gebildet, die mobile Phase befindet sich in den Kornzwischenräumen. Beide Phasen tauschen über die Gelporen Flüssigkeit und gelöste Stoffe aus. Obwohl die Trenn- vorgänge gründlich untersucht wurden, konnten sie nicht voll- ständig aufgeklärt werden. Hauptsächlich maßgeblich für den Trennvorgang ist die Molekülgröße, aber auch die Molekülform, sowie nicht-kovalente Wechselwirkungen mit der Gelmatrix be- einflussen ihn erheblich. Die funktionell wichtigste Struk- tureigenschaft der Gelpartikel ist daher bei den meisten Gel- len, wie z.B. Sepharose CL-2B^R, die Größe der Poren und bei einigen anderen, wie z.B. Blue Sepharose^R for affinity chro- matography, die Neigung der Matrix mit bestimmten Stoffen Wechselwirkungen einzugehen. Überlagerungen beider Phänomene machen den Trennvorgang unübersichtlich und sind daher meist unerwünscht, aber nur selten ganz zu vermeiden.

Handelt es sich wie in dieser Arbeit um eine Auftrennung nach der Molekülgröße, so interessieren vor allem die Poren der Gelkörner. Es handelt sich dabei um Aussparungen definier- ter Größe, die von der Oberfläche bis ins Innere der Gelpar- tikel reichen. Diejenigen Moleküle, die größer sind als die Porenöffnungen, werden dem Strom zwischen den Körnern fol- gend als erste eluiert, während die kleineren Moleküle Umwe- ge in die Gelkörner machen und das Gel folglich langsamer durchwandern. Je kleiner die Moleküle sind, desto länger wer- den die Umwege und desto später verlassen sie das Gelbett. Das gilt allerdings nur innerhalb des jeweiligen Trennbe- reichs, der von der Porengröße vorgegeben und für das be- treffende Gel charakteristisch ist. Alle Moleküle, welche die trennbaren Molekülmaße über- oder unterschreiten, können

nur durch ein Gel mit weiteren bzw. engeren Poren differenziert werden.

3.1.6 Struktur und Eigenschaften von Sepharose CL 2B

Sepharose CL wird durch Vernetzen von Sepharose mittels 2,3 Dibrompropanol unter stark alkalischen Bedingungen hergestellt. Durch die Quervernetzung wird die thermische und chemische Stabilität des Agarosegels erhöht, aber seine Porosität nicht verändert. Die Abbildung 6 zeigt eine Vernetzungsstelle zweier monomerer Stränge. Diese Quervernetzungen finden fast ausschließlich innerhalb einer Faser statt und verbinden nicht die Fasern untereinander, wie die Abbildung 7 zeigt. Sepharose CL wird für 3 Trennbereiche hergestellt. Die Ausschußgrenzen betragen für Proteine $40 \cdot 10^6$, $20 \cdot 10^6$ und $4 \cdot 10^6$ Daltons. In dieser Arbeit kam das erstere zur Anwendung. Die Gele sind für wäßrige Lösungen in einem pH-Bereich von 3 bis 14 geeignet. Bei pH 7 können sie mehrmals mit einer Temperatur von 110°C bis 120°C autoklaviert werden. Die mechanische Festigkeit nimmt mit wachsender Maschenweite ab (Pharmacia fine Chemicals, 1980).

3.1.7 Grenzen der Meßgenauigkeit bei der Probenherstellung

Bei einer Wellenlänge von 260 nm absorbiert, wie schon erwähnt, nicht nur die DNA, sondern auch das Protein. Folglich sind die Flächen, welche die bei der UV-Ausmessung gewonnenen Kurven mit der Grundlinie einschließen, ein Maß für den Gesamtgehalt der Proben an DNA und RSA. Ein genauer Vergleich der Flächen zeigt nun, daß diese nicht identisch sind. Der Grund dafür liegt nicht nur in Veränderungen des Absorptionsverhaltens aufgrund von Strahleneinwirkung und SDS-Zugabe, sondern auch in unvermeidlichen Fehlern beim Einwiegen der

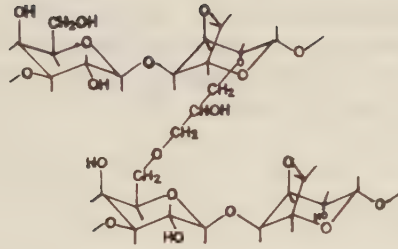


Abb. 6: Struktur der Vernetzungen in Sepharose CL

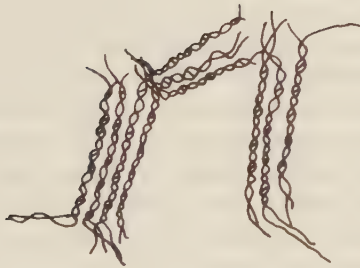


Abb. 7: Lage der Vernetzungen in Sepharose CL

Substanzen. Für diese Arbeit stand eine Analysenwaage zur Verfügung, die bis auf 0,1 Milligramm ablesbar war. Die letzte Stelle hatte jedoch auch bei sorgfältigstem Arbeiten einen Schwankungsbereich von $\pm 0,2$ mg. Bei der geringen Menge von 1 mg DNA bedeuteten aber Schwankungen von $\pm 0,2$ mg einen Fehler von einem Fünftel der gesamten DNA-Menge. So ist es zu erklären, daß die Gesamtextinktionen der Proben etwa zwischen 1,6 und 1,9 lagen.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Eichkurven für die Proteinbestimmungen

3.2.1.1 Proteinbestimmung nach Sedmak und Grossberg

Wie schon im methodischen Abschnitt dargestellt, wurde bei den Versuchen ohne SDS die Proteinbestimmung nach Sedmak und Grossberg durchgeführt, die noch Proteinmengen von weniger als 1 μg anzuzeigen vermag. Sie beruht darauf, daß die Farbstoffanionen des Coomassie Blau mit den NH_3^+ -Gruppen des Proteins reagieren, und es zu einer Komplexbildung mit einem raschen Farbumschlag der Lösung von braun nach blau kommt. Um die Methode auch quantitativ verwerten zu können, wurde festgestellt, ob und in welchem Bereich die Proportionalität zwischen RSA-Konzentration und Extinktion bei den gegebenen Versuchsbedingungen gewährleistet ist. Dazu wurden Lösungen von nativem RSA, aber auch Proben, die mit einer Dosis von 1760 Gy unter den verschiedenen Gasbedingungen bestrahlt worden waren, verwendet. Dabei ergab sich die Abbildung 8. Es kann bei allen Versuchsbedingungen ein linearer Extinktionsanstieg in einem Bereich von 20 bis 100 μg RSA angenommen werden. Die Gerade geht aber nicht durch Null, sondern schneidet die Ordinate bei 0,11. Die Werte für die bestrahlten Proben lagen innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung.

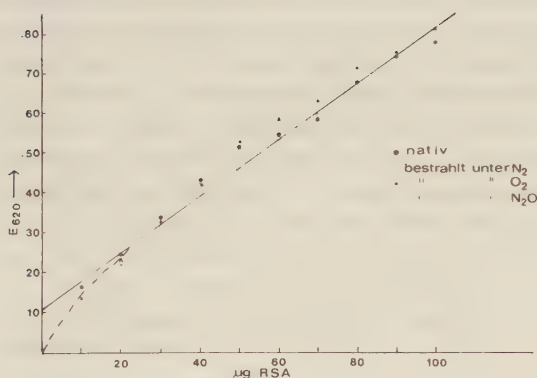


Abb. 8: Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Sedmak und Grossberg für natives und bestrahltes RSA

3.2.1.2 Proteinbestimmung nach Wang

Durch SDS wird die Komplexbildung des Proteins mit Coomassie Blau gestört, so daß bei den SDS-haltigen Proben die Proteinbestimmung nach Wang angewandt wurde. Grundlage dieser Methode ist das Folin-Phenol-Reagenz nach Folin und Ciocalteu. Die darin enthaltenen gemischten Säuren bilden schließlich den Farbstoff und beinhalten folgende Verbindungen:



und



Proteine bewirken eine Reduktion der gemischten Säuren, wobei Wolfram und/oder Molybdän 1, 2 oder 3 Sauerstoffatome verlie-

ren. Die dabei entstehenden Verbindungen haben eine charakteristische blaue Farbe ($\lambda_{\max}$ 745-750). Die Farbbildung wird vor allem durch Tyrosin und Tryptophan und zu einem geringen Anteil durch Cystin, Cystein und Histidin bewirkt. Auch die Peptidbindungen wirken reduzierend. Die Eichgeraden, die für die Proteinbestimmung nach Wang ermittelt wurden, zeigten im Bereich von 20 bis 200 μg RSA einen linearen Anstieg der Extinktion (Abb. 9), und zwar erhielt man für das unter verschiedenen Gasbedingungen bestrahlte RSA gleiche Werte wie für das unbestrahlte RSA (Peterson, 1979).

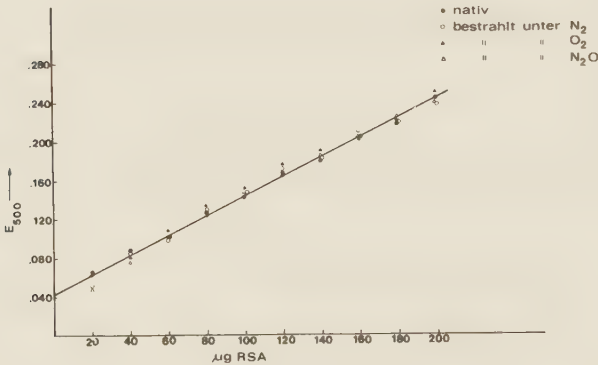


Abb. 9: Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Wang für natives und bestrahltes RSA in Gegenwart von SDS

3.2.2 Auftrennungen nativer Proben

Zur Beurteilung des Auftrennungsvermögens der Säulen und der strahleninduzierten Veränderungen an den Modellsubstanzen mußten zunächst einige Vergleichstrennungen nativer Proben

mit und ohne SDS durchgeführt werden. Die DNA wird im Ausschlußvolumen eluiert und bildet auf dem Diagramm ab Fraktion 50 einen hohen, steil ansteigenden Gipfel. Sein Maximum erreicht er nach 5 Fraktionen. Der Extinktionsrückgang ist gegenüber dem Anstieg etwas verzögert. Obwohl bereits 10 Fraktionen hinter dem Maximum die Extinktion wieder auf ein Achtel gefallen ist, sind noch in 20 bzw. mit SDS in 35 weiteren Fraktionen DNA-Bruchstücke zu finden. Trotzdem sind DNA und RSA deutlich voneinander getrennt. Mit der Bestimmung nach Sedmak läßt sich erst ab Fraktion 140 Protein nachweisen, nach Wang schon ab Fraktion 120. Mit SDS wird das Protein über mehr Fraktionen eluiert als ohne, der Peak ist, von einer vorgelagerten Erhebung abgesehen, symmetrischer (Abb. 10 und Abb. 11).

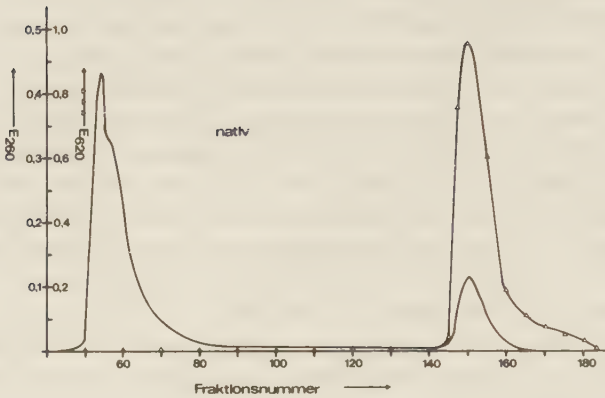


Abb. 10: 1 mg DNA und 10 mg RSA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7

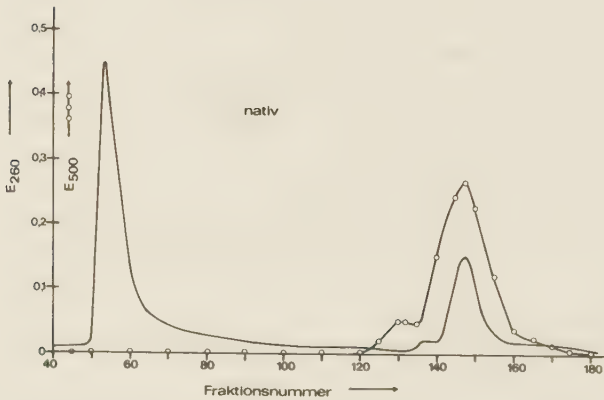


Abb. 11: 1 mg DNA und 10 mg RSA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Inkubation mit 100 mg SDS über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7, versetzt mit 0,5 % (W/V) SDS

3.2.3 Veränderungen des Absorptionsverhaltens der Proben durch Röntgenstrahlen und SDS

Um etwas über strahleninduzierte Veränderungen des Absorptionsverhaltens der Lösungen zu erfahren, wurde bei den meisten Proben die Gesamtextinktion vor und nach dem Bestrahlen gemessen. Außerdem wurde bei 3 Proben je ein Spektrum vor und nach dem Bestrahlen und nach Zugabe von SDS aufgenommen. Die Gasbedingungen wurden dabei variiert. Die Spektren zeigen alle folgendes typische Bild:

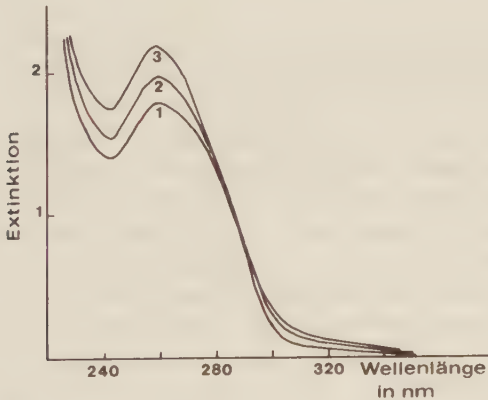


Abb. 12: Spektren von 1 mg DNA und 10 mg RSA, gelöst in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer pH 7

1. Unbestrahlte Probe
2. Probe nach Bestrahlung unter N_2 mit 1760 Gy
3. Probe nach Bestrahlung unter N_2 mit 1760 Gy und Inkubation in 1 % (W/V) SDS

Der Extinktionsgipfel lag immer bei 260 nm und der Kurvenverlauf blieb stets derselbe. Nur die Höhe der Extinktion wuchs sowohl durch die Strahleneinwirkung als auch durch die Zugabe von SDS. Die Höhe der Extinktionszunahme war für alle Gasbedingungen verschieden.

Dosis [Gy]	Extinktionserhöhung [%] bei Bestrahlung			
	unter	N ₂	O ₂	N ₂ O
440		3	4	7
880		13	11	10
1760		19	13	19

3.2.4 Auftrennungen bestrahlter Proben von DNA ohne RSA

Vor einer gemeinsamen Bestrahlung von DNA und RSA war es zunächst nötig, das Verhalten der Einzelsubstanzen unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu untersuchen. Da die Radiolyse von RSA schon von Leithner (1983) und Soldner (1981) untersucht worden ist, fehlten nur noch Kenntnisse, wie die DNA durch Reaktion der Primärradikale in ihrem gelchromatographischen Verhalten verändert wird. Nun hätte aber ein noch einmal so umfangreiches Versuchsprogramm wie das bereits durchgeführte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt. Deshalb wurden 6 Versuche ausgewählt, um wenigstens einige Vergleichschromatogramme bestrahlter proteinfreier DNA-Proben zu erhalten. Mit gleicher Dosis von 440 Gy wurden je zwei DNA-Proben unter Stickstoff, Luft und Lachgas bestrahlt. Jeweils eine davon wurde ohne SDS und die andere mit SDS aufgetrennt.

Bei der genannten Dosis findet bereits ohne SDS sowohl unter Stickstoff als auch unter Luftsauerstoff ein vollständiger Abbau der DNA statt. Dabei entstehen offensichtlich ziemlich kleine, aber untereinander sehr ähnliche Bruchstücke. Die

Ausmessung bei 260 nm ergab nämlich zwei Gipfel zwischen den Fraktionen 125 und 165. Mit einer maximalen Extinktion von etwa 0,23 bei den Fraktionen 150 bzw. 147 erreichen die Peaks etwas mehr als die halbe Höhe des nativen DNA-Gipfels.

Unter N_2O hingegen findet man ein anderes Ergebnis. Zwar ist die DNA ebenfalls zu lauter Bruchstücken abgebaut, doch sind die Fragmente von sehr unterschiedlicher Größe. In den Fraktionen 70 bis 160 kommt es zur Elution von Nukleinsäurefragmenten. Die höchsten Extinktionen von etwa 0,07 finden sich zwischen den Fraktionen 110 und 120. Wie Flächenmessungen an den Peaks ergaben, wurden alle 3 Proben, unabhängig von den Gasbedingungen, fast vollständig eluiert.

Auch in Gegenwart von SDS sind die Peaks, welche unter N_2 und unter O_2 entstehen, fast identisch. Sie erscheinen aber etwa 20 Fraktionen später. Die Maxima liegen um gut ein Drittel höher als bei den ohne SDS gewonnenen Peaks. Bei den unter N_2O bestrahlten Proben ist der Unterschied zwischen der Auftrennung ohne SDS und der mit SDS noch deutlicher. Die DNA-Bruchstücke zerfielen hier in Gegenwart von SDS wesentlich stärker. Die hauptsächliche Elution fand zwischen den Fraktionen 120 und 180 statt, also fast so spät wie bei den Versuchen unter N_2 und unter O_2 . Freilich waren die Fragmente nicht so einheitlich in ihrer Größe und der Peak nicht so schlank und symmetrisch wie bei den anderen Gasbedingungen. Das Maximum, bei Fraktion 160 gelegen, ist mit $\epsilon = 0,16$ gut doppelt so hoch wie bei Abwesenheit von SDS. Einmal wegen der üblichen Extinktionserhöhung durch SDS, zum anderen durch die höhere Konzentration, die durch die Elution in wenigen Fraktionen bedingt ist.

3.2.5 Auftrennungen unter N_2 bestrahlter Proben von DNA und RSA

Bereits bei einer Dosis von 440 Gy unter N_2 ist das DNA-Maxi-

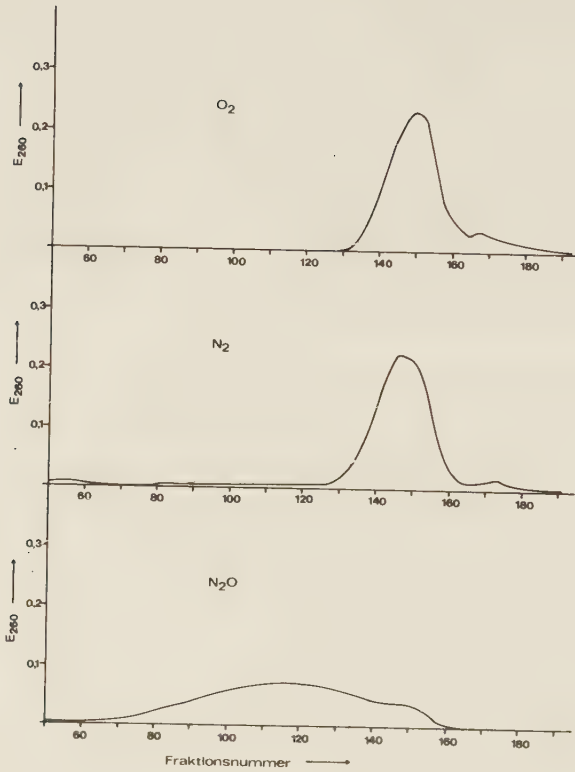


Abb. 13: 1 mg DNA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Bestrahlung mit 440 Gy unter verschiedenen Gasbedingungen über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7

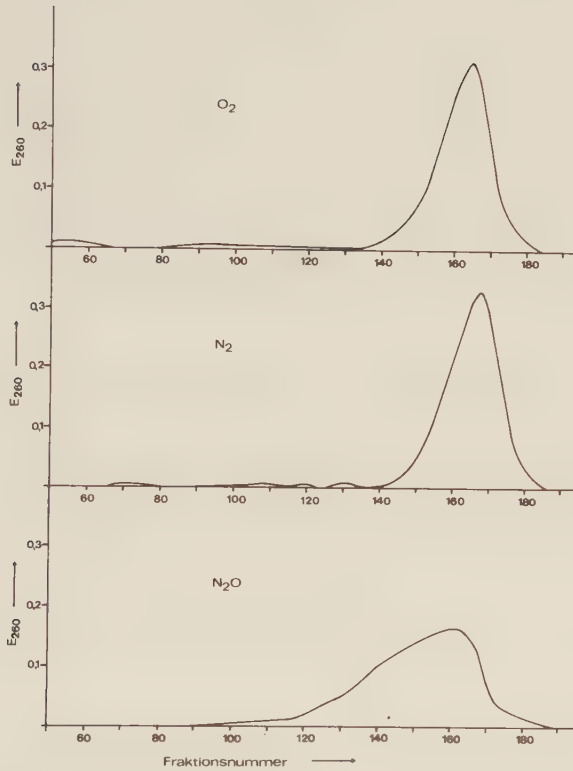


Abb. 14: 1 mg DNA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Bestrahlung mit 440 Gy unter verschiedenen Gasbedingungen sowie Inkubation mit 100 mg SDS über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7, versetzt mit 0,5 % (W/V) SDS

zum gegenüber der nativen Probe um die Hälfte erniedrigt. Die Grundlinie wird zwischen dem DNA- und dem RSA-Gipfel nicht mehr ganz erreicht. Obwohl man das meiste Protein im Elutionsbereich des nativen RSA wiederfindet, ist ein sehr kleiner RSA-Anteil, wie die Proteinbestimmung zeigt, bis zum DNA-Peak vorgewandert. Bei der mit doppelter Dosis bestrahlten Probe weist das Diagramm die eben beschriebenen Merkmale in verstärktem Maße auf. Der DNA-Peak hat sich weiter erniedrigt und verbreitert, desgleichen der RSA-Peak, dessen Maximum jetzt außerdem fünf Fraktionen weiter vorne liegt. Das vorgewanderte Protein ist trotz weiter abgebauter DNA mehr geworden.

Nach einer Dosis von 1760 Gy ist der größte Teil der DNA-Moleküle zu Bruchstücken verschiedener Größe zerfallen, so daß sie im gesamten Elutionsbereich verteilt erscheinen. Ein Maximum bei der Fraktion 55 weist auf einen Rest nicht oder nur wenig zerstörter DNA-Ketten hin. Das Proteinmaximum ist nochmals 5 Fraktionen vorgerückt. Allerdings handelt es sich hier bereits um ein Gemenge aus Protein und sehr kleinen Nukleinsäurebruchstücken. Die Proteinbestimmung zeigt, daß zwar der RSA-Hauptanteil nach wie vor im letzten Drittel der Trennung erscheint, doch noch mehr Protein als bei den vorausgegangenen Versuchen wird vorzeitig eluiert.

In Gegenwart von SDS wiederholen sich die geschilderten Phänomene weitgehend. Lediglich die gemessenen Extinktionswerte sind höher, einmal wegen des durch SDS bedingten Extinktionsanstiegs, zum anderen durch vollständigere Elution der Proben aus dem Gel. Besonders bei 1760 Gy ist mit SDS deutlich mehr UV-absorbierendes Material im Bereich des nativen DNA-Peaks zu finden, welches ohne SDS durch Wechselwirkungen mit dem Gel erst verspätet oder auch gar nicht mehr eluiert wurde.

Durch Bestimmung der Flächen unter den 6 Proteinkurven gelang es, die prozentualen Anteile des vorzeitig eluierten Proteins zu ermitteln und die dazugehörigen G-Werte zu errechnen. Da-

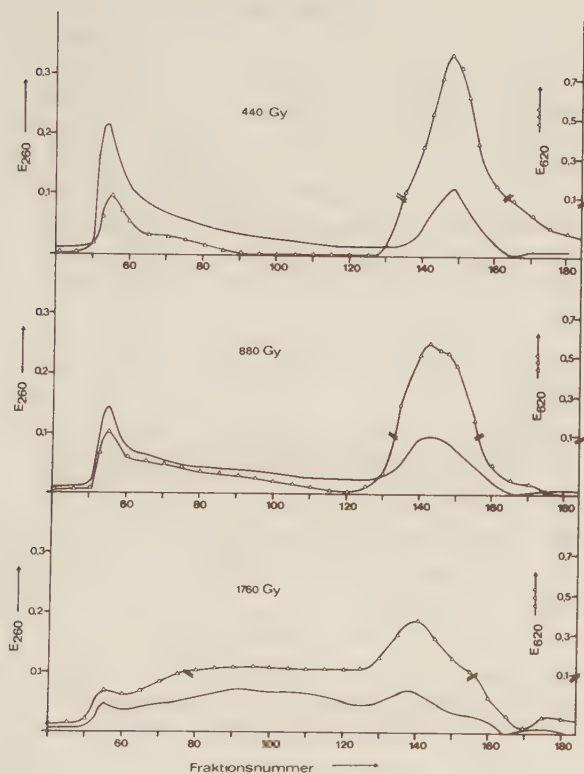


Abb. 15: 1 mg DNA und 10 mg RSA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Bestrahlung unter N_2 mit verschiedenen Dosen über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7

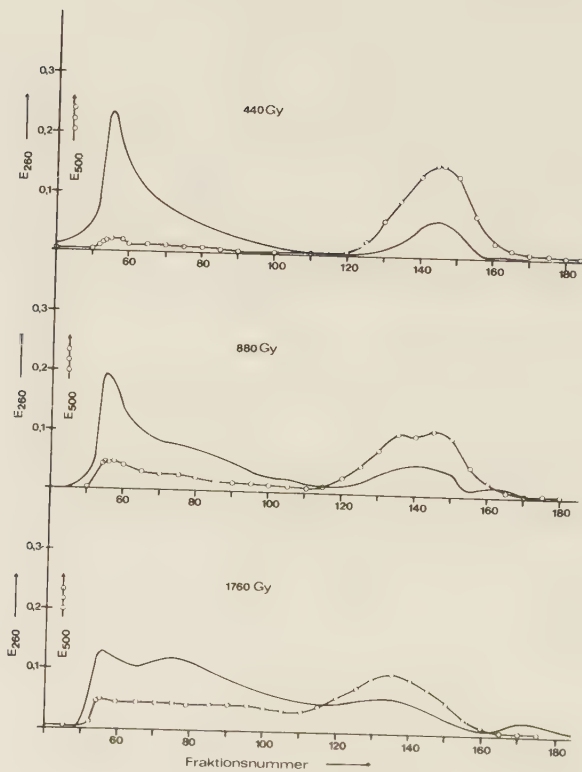


Abb. 16: 1 mg DNA und 10 mg RSA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Bestrahlung unter N_2 mit verschiedenen Dosen sowie Inkubation mit 100 mg SDS über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7, versetzt mit 0,5 % (W/V) SDS

bei wurde alles Protein berücksichtigt, das dem bei der Gelfiltration des nativen RSA erhaltenen Peak vorgelagert war, ganz gleich, ob es durch Aggregation oder Vernetzung mit DNA früher eluiert wurde.

Dosis [Gy]	vorzeitig eluiertes Protein [%]	G-Wert
Nach Gelfiltration ohne SDS		
440	15	0,049
880	32	0,053
1760	47	0,039
Nach Gelfiltration mit SDS		
440	10	0,033
880	20	0,033
1760	48	0,040

Die Tatsache, daß Protein bis zu Fraktionen des Ausschlußvolumens vorgewandert ist, läßt vermuten, daß dieses Albumin durch Strahleneinwirkung an die DNA gebunden wurde. Eine theoretische Möglichkeit wäre aber auch, daß es sich bei dem vorgewanderten Protein um RSA-Aggregate handelt, die aufgrund ihrer Größe früher eluiert werden. Um das mit Sicherheit ausschließen zu können, wurde eine reine RSA-Probe mit einer Dosis von 1760 Gy unter Stickstoff bestrahlt, mit SDS versetzt und aufgetrennt (Abb. 17). Das gesamte Protein fand sich in den Fraktionen 110 bis 185. Das Chromatogramm zeigt zwei Gipfel, die bei Fraktion 143 ein Minimum haben. Der erste, welcher die Aggregate anzeigt, erreicht sein Maximum bei Fraktion 129; der zweite, höhere, der für den monomeren Anteil steht, hat es bei Fraktion 151. Es wird also ohne Anwesenheit von DNA kein RSA vor Fraktion 110 eluiert.

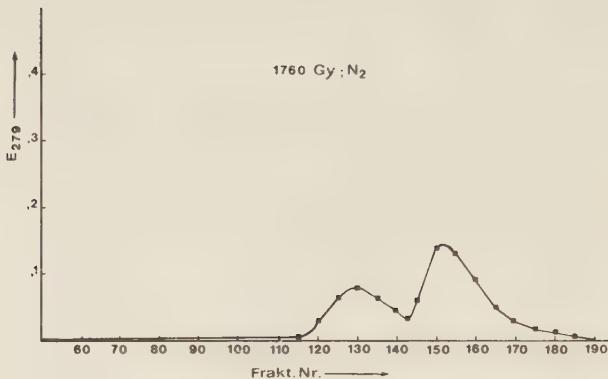


Abb. 17: 10 mg RSA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Bestrahlung unter N_2 mit 1760 Gy sowie Inkubation mit 100 mg SDS über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7, versetzt mit 0,5 % (W/V) SDS

3.2.6 Auftrennungen unter Luft bestrahlter Proben von DNA und RSA

Nach dem Bestrahlen der ersten Probe unter Luft mit einer Dosis von 440 Gy zeigte sich, daß der Abbau der DNA unter Sauerstoff sehr viel stärker war als unter Stickstoff. Daher lag es nahe, zuerst einmal nach noch niedrigeren Dosen die Gelfiltration durchzuführen. Unter diesen Bedingungen ließ sich der Abbau der DNA zeigen. Nach einer Dosis von 147 Gy ähnelt das Bild noch weitgehend dem der nativen Probe. Der DNA-Peak hat lediglich etwas an Höhe verloren, und es zeigt sich etwas

stärkeres "Tailing". Nach einer Dosis von 293 Gy wird noch die halbe Gipfelhöhe erreicht, und ein Teil der Nukleinsäurefragmente wird bereits durch die Säule zurückgehalten. Nach einer Dosis von 440 Gy ist der DNA-Peak weitgehend abgebaut. Eine Einwanderung von DNA-Bruchstücken in den Proteinpeak findet bei den niedrigen Dosen noch nicht statt. Am Proteingipfel treten keine mit diesem Trenngel beobachtbaren Veränderungen auf, so daß dieser sich jedesmal reproduziert.

Vergleicht man die Versuche ohne SDS mit denen, welche in Gegenwart von SDS chromatographiert wurden, so sieht man, daß durch die Einwirkung von SDS der Abbau bei gleicher Dosis weiter fortgeschritten ist. Die Extinktionswerte der DNA-Maxima liegen um etwa 0,1 niedriger als bei den Versuchen ohne SDS. Nach 440 Gy findet man im Bereich des nativen DNA-Peaks mit SDS nur noch sehr wenig UV-absorbierendes Material, und eine Einwanderung von kleinen DNA-Bruchstücken in den RSA-Gipfel ist bereits deutlich erkennbar. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß die Bruchstücke zunächst noch durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten werden, welche dann durch das SDS aufgehoben werden.

Durch Erhöhen der Strahlendosis wurden nun die DNA-Bruchstücke weiter aufgespalten. Nach 880 Gy findet man vor Fraktion 80 praktisch kein UV-absorbierendes Material mehr. Erst danach beginnt die Elution der Nukleinsäurefragmente, die bis in den Bereich des Elutionsvolumens des RSA reicht, wodurch die Extinktionswerte in diesen Fraktionen erhöht werden. Am Peak der Proteinbestimmung hat sich kaum etwas geändert, aber es wird in den vorgelagerten Nukleinsäurefragmenten ein, wenn auch äußerst geringer Proteingehalt angezeigt. Nach einer Dosis von 1760 Gy rückt das DNA-Maximum nochmals etwa 8 Fraktionen nach hinten. DNA-Fragmente und RSA werden gleichzeitig eluiert, wodurch die Extinktion dieses Peaks sich abermals erhöht. Der DNA folgend zieht sich auch das vorgewanderte Protein wieder etwas in den Hauptpeak zurück, der auch bei dieser Dosis im wesentlichen gleichbleibt.

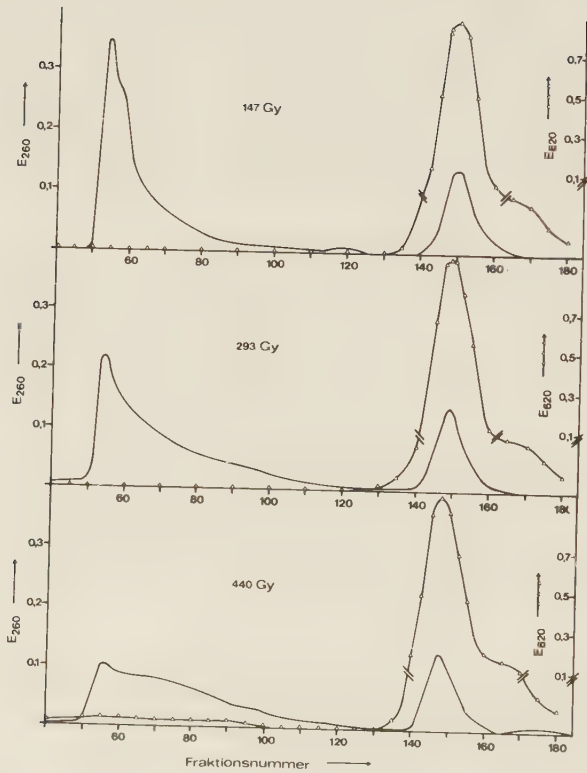


Abb. 18: 1 mg DNA und 10 mg RSA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Bestrahlung unter Luft mit verschiedenen Dosen über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7

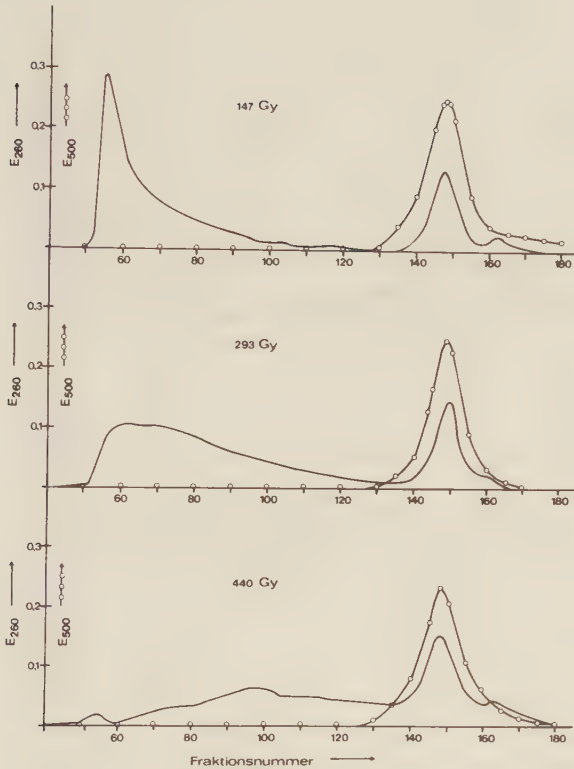


Abb. 19: 1 mg DNA und 10 mg RSA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Bestrahlung unter Luft mit verschiedenen Dosen sowie Inkubation mit 100 mg SDS über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7, versetzt mit 0,5 % (W/V) SDS

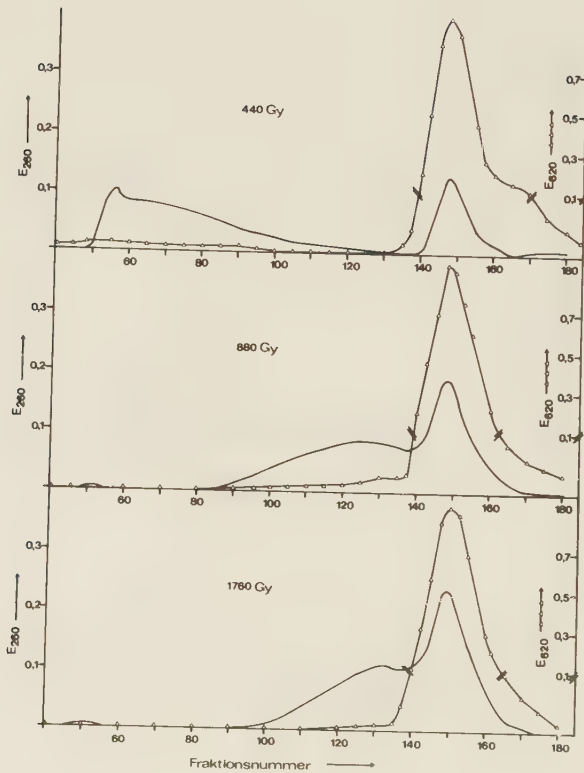


Abb. 20: 1 mg DNA und 10 mg RSA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Bestrahlung unter Luft mit verschiedenen Dosen über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7

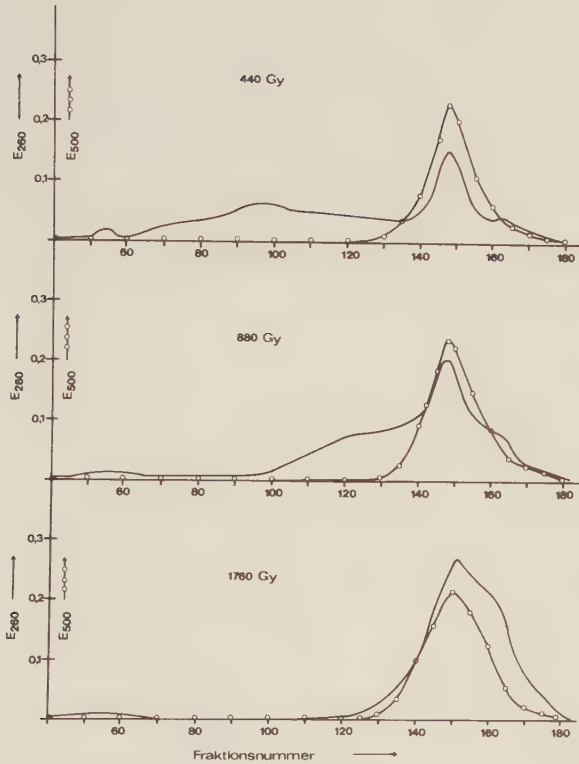


Abb. 21: 1 mg DNA und 10 mg RSA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Bestrahlung unter Luft mit verschiedenen Dosen sowie Inkubation mit 100 mg SDS über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7, versetzt mit 0,5 % (W/V) SDS

In Gegenwart von SDS ist auch bei den hohen Dosen der DNA-Abbau stärker. Die Elution der Nukleinsäure beginnt etwa 10 Fraktionen später als ohne SDS. Bereits bei 880 Gy gibt es nur noch ein Maximum. Während selbst nach 1760 Gy bei Chromatographie ohne SDS DNA und RSA noch getrennt werden, erscheinen sie in Gegenwart von SDS in einem breiten Peak verschmolzen, dessen Maximum 5 Fraktionen hinter dem üblichen Maximum für RSA liegt. Proteinverwanderungen sind in Gegenwart von SDS nicht zu beobachten, entweder, weil nicht-kovalente Bindungen zwischen DNS und RSA durch SDS aufgelöst worden sind, oder weil die Proteinbestimmung nach Wang einfach nicht empfindlich genug ist, um so geringe Proteinmengen anzuzeigen.

3.2.7 Auftrennungen unter N_2O bestrahlter Proben von DNA und RSA

Da beim Bestrahlen von DNA und RSA unter N_2O der Zerfall der Nukleinsäureketten fast stärker war als unter O_2 , war es notwendig, mit noch kleineren Dosen zu beginnen, um den Abbau beobachten zu können. Es wurde daher mit Dosen von 110, 220 und 440 Gy bestrahlt. Es ist hier auch vor auszuschicken, daß beim Auftrennen der unter N_2O bestrahlten Proben Wechselwirkungen mit dem Gel auftraten, welche viel stärker waren als nach Bestrahlungen unter O_2 oder etwa unter N_2 . Dadurch kam es ohne SDS zu Elutionsverzögerungen und nicht unerheblichen Verlusten vor allem an Nukleinsäure.

Durch den verstärkten Abbau und die unvollständige Elution hat der DNA-Peak bereits nach einer Dosis von 110 Gy mehr als die halbe Höhe verloren. Die Elution von zerbrochener DNA erstreckt sich bis zum Proteinpeak. Bei der doppelten Dosis zeichnet die UV-Linie das Bild eines flachen Hügels, der von Fraktion 50 bis zu Fraktion 80 konvex ansteigt und dann ab-

fällt, bis er etwa bei Fraktion 130 in den Proteinpeak einmündet. Bei 440 Gy ist die DNA über einen noch weiteren Elutionsbereich verteilt und der RSA-Peak ist durch Einwanderung von Nukleinsäurebruchstücken erhöht.

Die Ausmessung der Proteinbestimmung hat bei allen drei Dosen fast identische Peaks ergeben, welche auch mit denen unter Sauerstoff weitgehend übereinstimmen. Man kann wieder Elution von Protein vor dem RSA-Peak erkennen, die mengenmäßig zwischen den Versuchen unter Stickstoff und unter Sauerstoff liegt.

Bei den Auftrennungen mit SDS waren die Wechselwirkungen zwischen den Probesubstanzen und dem Gel aufgehoben. Nur diese Versuche geben daher den strahlenbedingten Abbau der DNA völlig unverfälscht wieder. Die Frage, ob die DNA-Bruchstücke ohne SDS durch nicht-kovalente Bindungen zu größeren Einheiten zusammengehalten werden, läßt sich nicht beantworten, da die Maxima durch die Wechselwirkung der DNA mit dem Gel ohne SDS niedriger sind als mit SDS.

Bei 110 Gy mit SDS ist der DNA-Peak gegenüber dem nativen nur um ein Viertel erniedrigt und entsprechend verbreitert. Bei 220 Gy fehlen ihm mehr als drei Viertel seiner Höhe. Das abgebaute Material findet sich in abfallender Konzentration in allen Fraktionen bis zum Proteinpeak. Bei 440 Gy schließlich wird die Nukleinsäure hauptsächlich zwischen den Fraktionen 60 bis 110 eluiert, was darauf hindeutet, daß überwiegend Bruchstücke mittlerer Größe entstanden sind. Nur relativ wenig kleine sind schon in den RSA-Bereich eingedrungen.

Die Maxima der Proteinkonzentration stimmen bei allen drei Dosen ziemlich überein. Die Empfindlichkeit der Wangschen Methode reicht wie bei den Versuchen unter Luft nicht aus, eventuell kovalent an Nukleinsäure gebundenes Albumin mit Sicherheit nachzuweisen.

Betrachtet man die Diagramme der mit 880 Gy und 1760 Gy bestrahlten Proben, so sieht man, daß die Nukleinsäuren sehr weit abgebaut worden sind. Bei 880 Gy zeigt die UV-Ausmes-

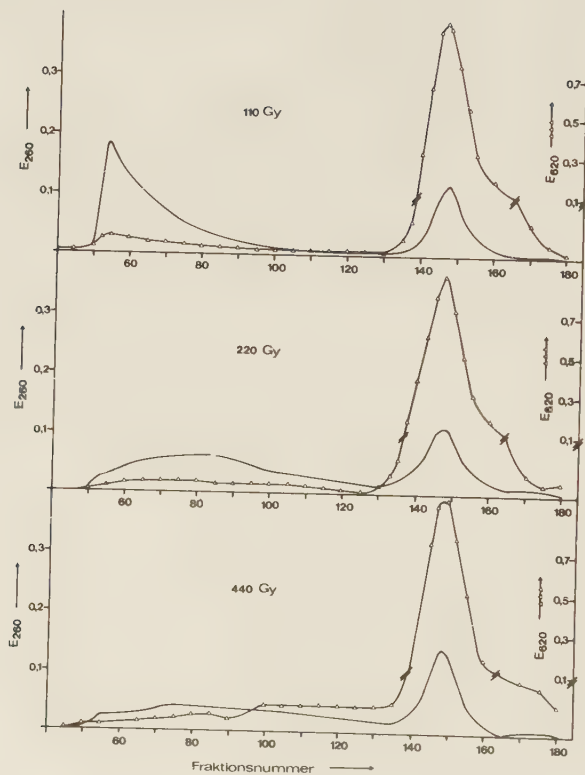


Abb. 22: 1 mg DNA und 10 mg RSA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Bestrahlung unter N_2O mit verschiedenen Dosen über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7

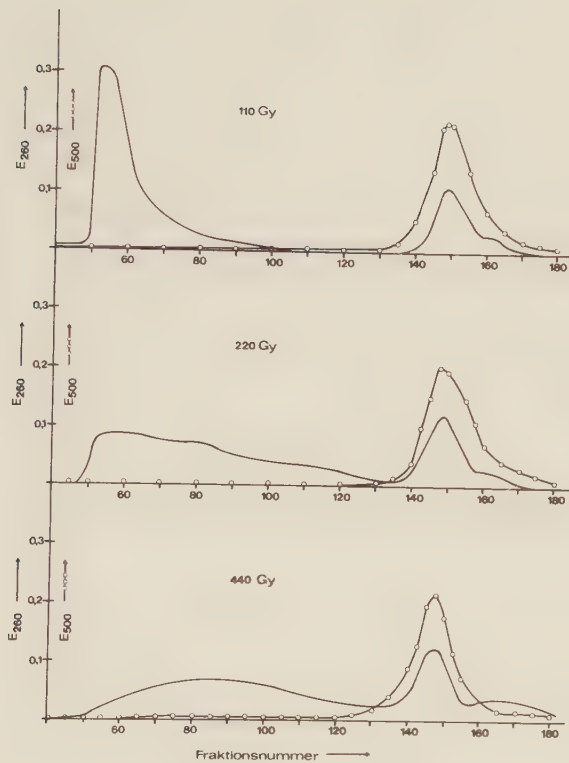


Abb. 23: 1 mg DNA und 10 mg RSA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Bestrahlung unter N_2O mit verschiedenen Dosen sowie Inkubation mit 100 mg SDS über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7, versetzt mit 0,5 % (W/V) SDS

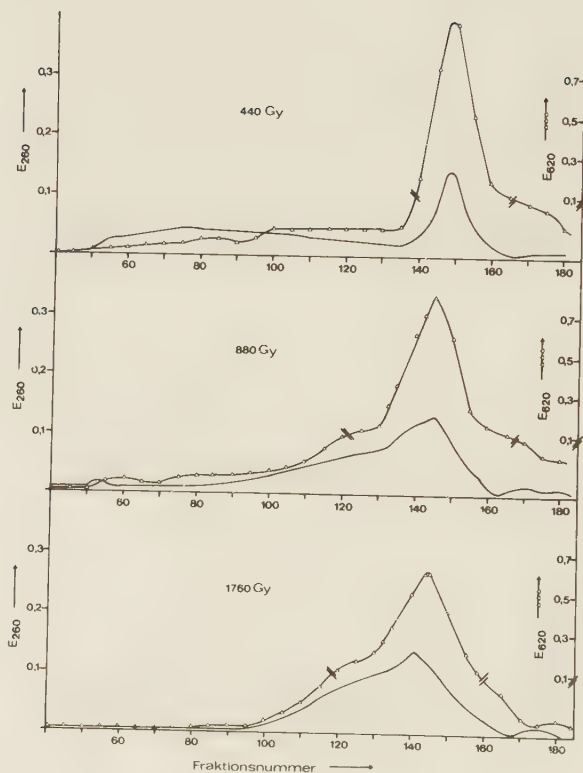


Abb. 24: 1 mg DNA und 10 mg RSA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Bestrahlung unter N_2O mit verschiedenen Dosen über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7

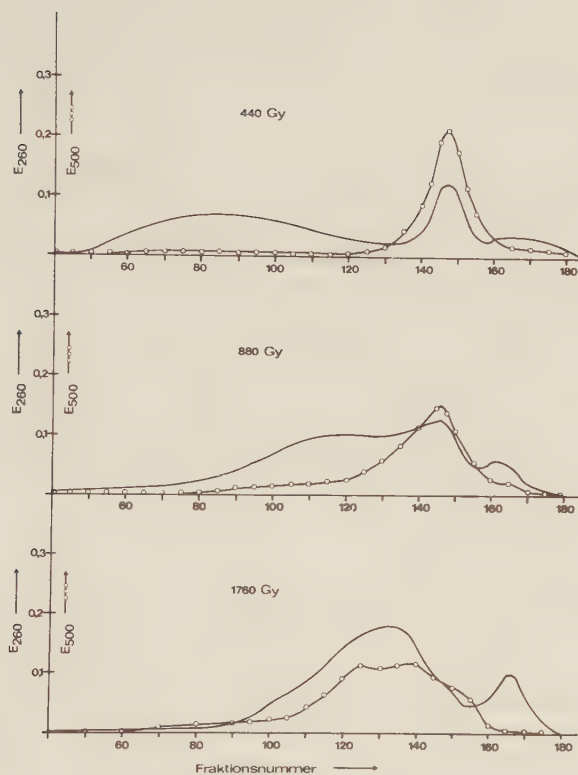


Abb. 25: 1 mg DNA und 10 mg RSA in 10 ml 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer. Auftrennung nach Bestrahlung unter N_2O mit verschiedenen Dosen sowie Inkubation mit 100 mg SDS über Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7, versetzt mit 0,5 % (W/V) SDS

sung, daß die Elution der Biomoleküle sich von Fraktion 70 bis Fraktion 165 erstreckt und bei Fraktion 145 die höchste Extinktion von 0,13 erreicht. Bei 1760 Gy beginnt die Erhebung gut 20 Fraktionen später und hat bei Fraktion 140 mit $\epsilon = 0,14$ ihr Maximum. Auch in Gegenwart von SDS findet man bei den UV-Messungen jeweils nur mehr eine breite Verteilung. Während sie sich bei 880 Gy noch über 100 Fraktionen erstreckt, findet man nach 1760 Gy UV-absorbierendes Material nur in 75 Fraktionen und die Extinktionen liegen entsprechend höher. Das Maximum ist um etwa 10 Fraktionen auf Fraktion 135 vorgerückt. Als erwähnenswerte Randerscheinung ist ein kleiner Nachpeak im Bereich der Fraktion 155 bis 180 zu nennen, der sich bereits bei 440 Gy andeutet und mit wachsender Dosis immer mehr herausformt, bis er bei 1760 Gy die Höhe von $\epsilon = 0,1$ erreicht. Es muß sich dabei um eine Ansammlung sehr kleiner Nukleinsäurebruchstücke handeln, die ohne SDS gar nicht mehr eluiert werden. Verzögertes Protein kann es nicht sein, weil die Proteinfärbungen in diesem Bereich nur sehr schwach ansprechen.

Damit ist bereits die Überleitung hergestellt zur Besprechung der mit Hilfe der Proteinbestimmungen ermittelten Kurven bei 880 Gy und 1760 Gy. Je weiter die Nukleinsäurebruchstücke in den RSA-Bereich eindringen, desto breiter und niedriger werden die Gipfel der Proteinbestimmungen. Nach Bestrahlung unter Luftsauerstoff hatte sich der Proteinpeak trotz ähnlicher Einwanderungen von DNA bei Erhöhung der Dosis in Form und Lage kaum geändert, weil die DNA-Fragmente und die RSA-Moleküle, ohne nennenswerte Bindungen eingegangen zu sein, miteinander eluiert wurden. Unter N_2O sind offenbar wesentlich mehr Bindungen vorhanden, denn die Kurven der kolorimetrischen Proteinbestimmung passen ihre Form und Lage dem UV-Kurvenverlauf an. Die Fraktionen der noch relativ groß gebliebenen Nukleinsäurereste enthalten Protein. Dadurch wird es früher eluiert als aggregiertes RSA. Auch in Gegenwart von SDS kann man diese Beobachtung machen. Trotz der wesentlich

unempfindlicheren Bestimmungsmethode ist vorgewandertes RSA bei 880 Gy ab Fraktion 90 und bei 1760 Gy ab Fraktion 70 deutlich zu erkennen. Es kann daher kaum mehr daran gezweifelt werden, daß auch unter N_2O kovalente Bindungen zwischen DNA und RSA entstehen.

3.2.8 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

An erster Stelle ist hier zu den Bestrahlungen von DNA und RSA zu sagen, daß zum gleichen Abbau der Nukleinsäureketten zu Bruchstücken bei den verschiedenen Gasbedingungen unterschiedlich hohe Dosen erforderlich sind. Ein vergleichender Überblick für den strahleninduzierten Abbau der DNA wird in den Abb. 26 und 27 gegeben. Dabei wurde die Menge des UV-absorbierenden Materials des Peaks I bestimmt als prozentuale Fläche, wobei die Gesamtfläche als 100 % angesehen werden. Bei der unbestrahlten Probe von DNA und RSA werden 80 % bzw. 75 % in Gegenwart von SDS des UV-absorbierenden Materials im Peak I eluiert. Enthält die Probe nur DNA, dann werden 100 % des UV-absorbierenden Materials im Peak I eluiert. Nach Abb. 26 ist der Abbau in Gegenwart von O_2 stärker als unter N_2 , am stärksten erscheint er unter N_2O . Wie bereits vorher erwähnt, handelt es sich hierbei um ein Artefakt, da unter N_2O bestrahlte DNA verstärkte Wechselwirkung mit dem CL-Septarosegel eingeht und nicht vollständig eluiert wird. In der Abb. 27 sieht man, daß der Abbau der DNA in Gegenwart von RSA unter O_2 und N_2O gleich ist, während unter N_2 der strahleninduzierte Abbau sehr viel geringer ist. Zum Vergleich ist der Abbau der DNA eingezeichnet, wenn die Bestrahlung ohne RSA stattfand. Daran sieht man, daß das Protein eine Schutzfunktion ausübt und den Zerfall der Nukleinsäuremoleküle deutlich hemmt. Auch die Neigung von DNA und RSA, Bindungen miteinander einzugehen, ist abhängig von den Gasbedingungen. Unter N_2 wird relativ viel Protein an Nukleinsäure gebunden, unter N_2O etwas weniger und unter O_2 so gut wie keines mehr.

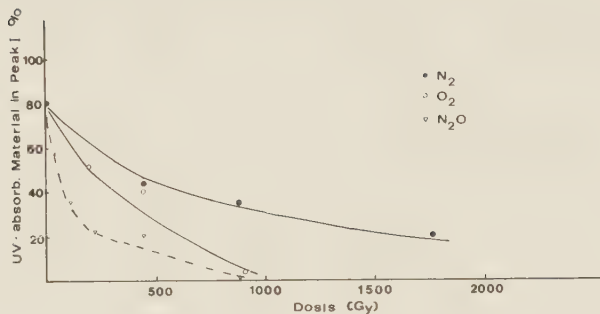


Abb. 26: Abnahme des UV-absorbierenden Materials im Peak I mit der Dosis, wenn DNA in Gegenwart von RSA (1 : 10) bei pH 7 bestrahlt wurde

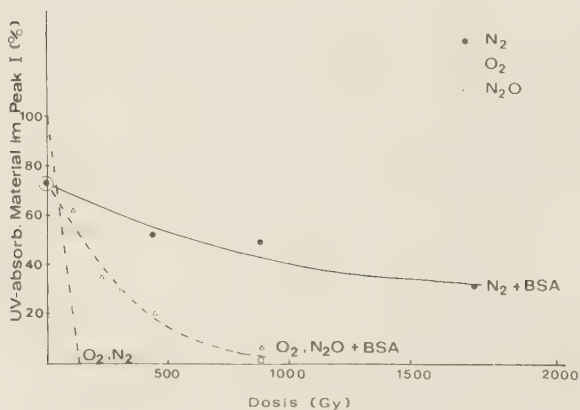


Abb. 27: Abnahme des UV-absorbierenden Materials im Peak I bei Gelfiltration in Gegenwart von SDS mit der Dosis nach Bestrahlung von DNA mit und ohne RSA bei pH 7

Die Auftrennungen mit SDS haben folgendes ergeben: Die DNA-Bruchstücke hängen nach dem Bestrahlen noch durch nicht-kovalente Bindungen teilweise zusammen. Die Bindungen zwischen DNA und RSA sind überwiegend kovalenter Natur. Die durch Wechselwirkungen zwischen den Proben und dem Gel bedingten Elutionsverzerrungen können durch SDS weitgehend vermieden werden.

4. Diskussion

Bei der nun folgenden Erörterung der Ergebnisse scheint es sinnvoll, etwa dieselbe Ordnung einzuhalten, in der diese im vorigen Abschnitt dargestellt wurden. Da zu Beginn des Ergebnisteils bereits die theoretischen Grundlagen zur Strahlenchemie des Wassers, zur Wahl der Gasbedingungen, zur Gelfiltration und zur Wirkung von SDS, sowie die Strukturen der Modellsubstanzen und des Trenngels erläutert wurden, wird darauf in diesem Abschnitt nicht mehr gesondert eingegangen. Vielmehr wird von Fall zu Fall aufgezeigt, wie diese Fakten möglicherweise das Gesamtergebnis beeinflusst haben.

4.1 Zur Auftrennung unbestrahlter Proben

An den unbestrahlten Proben konnten keine Wechselwirkungen zwischen DNA und RSA festgestellt werden, d.h. es wurde kein Protein im DNA-Peak nachgewiesen. Beim Vergleich der SDS-freien mit der mit SDS inkubierten Probe sind nur wenige Unterschiede zu beobachten. Die DNA-Peaks wurden nahezu identisch reproduziert, mit der kleinen Ausnahme, daß ohne SDS eine leichte Schulter auftrat. Wahrscheinlich ist diese auf Wechselwirkungen mit dem Gel zurückzuführen, die die Elution eines Teils der DNA etwas verzögerten. Beim Albumin war dagegen eine wesentlichere Abweichung festzustellen. In Gegenwart von SDS war das RSA bereits 20 Fraktionen früher im Eluat nachzuweisen als ohne SDS, obgleich die Proteinbestimmung nach Wang viel unempfindlicher ist als die nach Sedmak. Leithner, der gleiche Proben mit dem wesentlich engmaschigeren Bio-Gel A-15 m (200 bis 400 mesh) untersuchte, fand diesen Unterschied ausgeprägter vor. Er errechnete aus der beschleunigten Elution des RSA eine scheinbare Molekülvergrößerung um mehr als den Faktor 4, die er einmal auf das Ent-

stehen von SDS-RSA-Komplexen, und zum zweiten auf die teilweise Entfaltung der Moleküle zurückführt. Fish, Reynolds, Tanford (1970) geben an, daß SDS-Proteinkomplexe in Form von Stäbchen vorliegen, deren Länge dem Molekulargewicht proportional ist.

4.2 Zu den Veränderungen des Absorptionsverhaltens

Da bei allen Bestrahlungen von DNA eine Erhöhung der Gesamt-extinktion zu beobachten ist, stellt sich die Frage, welche molekularen Vorgänge hierfür verantwortlich sind. Dabei interessieren vor allem diejenigen Arbeiten, die sich mit der indirekten Strahlenwirkung auf DNA in vitro befassen. Nach Hagen (1973) sind die wichtigsten Strahlenschäden der Bruch der Nukleotidkette und Modifikationen der Basen. Ferner wurden Vernetzungen der Moleküle untereinander (Lett, J.T. Stacey, K.A. Alexander 1961) sowie Öffnungen von H-Brücken in doppelsträngiger DNA beobachtet (Hagen 1968).

Weil aber die Basen hauptsächlich für das Absorptionsverhalten verantwortlich sind, können die beschriebenen Schäden dieses beeinflussen. Bei doppelsträngiger DNA müssen zwei Phasen der Absorptionsänderung unterschieden werden. Im Anfangsstadium, bei noch intakter Doppelhelix, sind die Basen weitgehend vor Zerstörung geschützt. Die Wasserradikale bewirken hauptsächlich Strangbrüche, Öffnungen der H-Brücken und damit eine zunehmende Denaturierung, die mit einer Extinktionserhöhung einhergeht. Ist die Denaturierung soweit fortgeschritten, daß die Basen weitgehend offenliegen, überwiegt der Basenabbau, die Extinktion sinkt. Diese zweite Phase wurde in dieser Arbeit wohl nicht erreicht. Für diese Theorie sprechen Beobachtungen von Ward und Kuo (1978), die nach dem Bestrahlen einsträngiger DNA unter N_2O eine Abnahme der Extinktion feststellten, bei doppelsträngiger DNA dagegen eine Zunahme um etwas weniger als 40 % und dann eine Abnahme

wie bei der einsträngigen DNA. Auch die nach Zugabe von SDS beobachtete Extinktionszunahme muß folglich in der Weise verstanden werden, daß durch die Aufhebung der nicht-kovalenten Wechselwirkungen die DNA-Struktur aufgelockert wird und so die Basen besser hervortreten.

4.3 Zur Radiolyse der Modellsubstanzen

4.3.1 Zur Radiolyse der DNA

Wie schon im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, sind die hauptsächlichsten Strahlenschäden an der DNA die Strangbrüche, die Öffnungen von H-Brücken, die Basenmodifikationen und die Vernetzungsreaktionen. Zum Kettenbruch kann es sowohl durch Ester-spaltung als auch durch Zerstörung der Desoxyribose kommen. Dabei muß zwischen Einzel- und Doppelstrangbrüchen unterschieden werden. Nach Dertinger und Jung (1969) bezeichnet man Brüche als Doppelstrangbruch, wenn die beiden Bruchstellen auf den beiden Einzelketten bis zu 3 Nukleotidpaare voneinander entfernt sind. In wäßrigen Lösungen nehmen nach Hagen (1967) die Einzelstrangbrüche mit der Dosis, die Doppelstrangbrüche dagegen mit dem Quadrat der Dosis zu.

Was das Verhältnis des Nukleotidkettenabbaus zum Umfang von Vernetzungsreaktionen angeht, so fanden Bohne et al. (1970) bei Betahlungsversuchen an T_1 Bakteriophagen in wäßriger Lösung mit einer ^{60}Co - γ -Quelle lineare Anstiege der Doppelstrangbrüche und der Vernetzungen mit der Dosis etwa im Verhältnis 10 : 1. Durch das starke Übergewicht des Kettenabbaus ist es zu verstehen, daß bei unseren Versuchen keine Aggregate, sondern nur Bruchstücke gefunden wurden. Die Intensität des Abbaus war jedoch nicht bei allen Gasbedingungen gleich. Unter Luftsauerstoff und unter Stickstoff entstanden nur sehr kleine, aber einheitlich geformte Fragmente, unter Lachgas dagegen Bruchstücke sehr verschiedener Größe. Nur ein

geringer Teil davon war so klein wie diejenigen unter Luft und Stickstoff. Nach Inkubation mit SDS zeigte sich, daß zwischen den Bruchstücken noch nicht-kovalente Bindungen vorhanden waren. Es kam zu einem weiteren Zerfall der Bruchstücke. Das Maximum verschob sich dabei unter O_2 und unter N_2 um 20 Fraktionen und unter N_2O sogar um 40 Fraktionen zum kleineren Molekularbereich hin.

Bei der Erörterung dieser Beobachtungen sind die für die jeweiligen Gasbedingungen charakteristischen Radikalreaktionen von besonderem Interesse. Wie aus 3.1.1 hervorgeht, verhalten sich in Anwesenheit von Stickstoff die G-Werte der Wasserradikale folgendermaßen:

$$G_{(OH\cdot)} : G_{(e^-_{aq})} : G_{(H\cdot)} = 2,70 : 2,65 : 0,60 \quad (13)$$

Mit Sauerstoff reagieren die Elektronen nach Gleichung (8) zu $O_2^{\cdot-}$ und die H-Radikale nach Gleichung (9) zu $HO_2^{\cdot}$ -Radikalen. Es sind also primär nur noch $OH^{\cdot}$ -Radikale wirksam.

$$G_{(OH\cdot)} : G_{(e^-_{aq})} : G_{(H\cdot)} = 2,70 : 0,00 : 0,00 \quad (14)$$

Werden die Elektronen mit N_2O nach Gleichung (10) eliminiert, entstehen zusätzliche $OH^{\cdot}$ -Radikale.

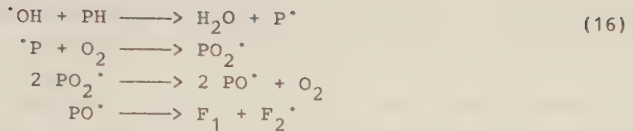
$$G_{(OH\cdot)} : G_{(e^-_{aq})} : G_{(H\cdot)} = 5,35 : 0,00 : 0,60 \quad (15)$$

Eine sehr schwierige Frage ist dabei, welche Radikale mit der DNA reagieren und wie weit sie zu ihrem Abbau beitragen. Will man die unter O_2 vorhandenen oxidierenden $OH^{\cdot}$ -Radikale allein für das starke Zerbrechen der DNA-Moleküle verantwortlich machen, so widerspricht das dem Ergebnis unter N_2O , wo die Bruchstücke trotz der erhöhten $OH^{\cdot}$ -Radikalkonzentration noch relativ groß waren. Da aber unter O_2 und unter N_2 ein gleich großer Effekt beobachtet wird, kann man auch nicht annehmen, daß es durch die Reaktion der hydratisierten Elektronen zur Bildung von Brüchen in der DNA kommt. Von Verberne (1981) wurde

auch gezeigt, daß die DNA in Form ihrer Doppelhelix nur sehr langsam mit Elektronen reagiert. Es ist auffallend, daß die Bruchbildung der DNA durch Radiolyse in Gegenwart von Sauerstoff nicht verstärkt ist. Diese durch Sauerstoff erhöhte Strahlensensibilität, die fast bei allen biologischen Objekten auftritt, wurde bereits 1951 von Hollaender als Sauerstoffeffekt bezeichnet. Eher könnte man bei diesen Versuchen von einer Art N_2O -Schutzeffekt sprechen.

Bezüglich der Bedeutung des Mediums Sauerstoff scheint ein Hinweis von Yamamoto (1976) von Interesse. Er sieht in der Hemmbarkeit durch Sauerstoff ein gemeinsames Charakteristikum strahleninduzierter Bindungsreaktionen von Makromolekülen in wäßrigen Systemen. Mee und Adelstein (1981) stellten eine relative Unwirksamkeit des $OH^\bullet$ -Radikals bei der Bildung von Vernetzungen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Peroxyradikalen fest. Sie führen diese Unwirksamkeit auf die Begrenzung der Lebenszeit der entstehenden Protein- bzw. DNA-Radikale durch den Sauerstoff zurück. Wenn man diese Aussagen zugrunde legt, könnte man sich folgendes Modell vorstellen: Unter aeroben Bedingungen beträgt die Konzentration des Sauerstoffs in Lösung $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, so daß die durch $OH^\bullet$ -Radikale erzeugten Radikalstellen an den DNA-Bruchstücken sehr schnell mit dem Sauerstoff reagieren, wodurch eine Rückreaktion verhindert wird. Kommt es an einem großen Fragment zu einem neuen Bruch mit Ausbildung einer Radikalstelle, so wiederholt sich der Vorgang, wobei immer kleinere Bruchstücke entstehen. Das Reaktionsgleichgewicht liegt weit auf seiten der Bruchstücke.

Denk und Schnabel (1982) haben dazu folgendes vereinfachtes Reaktionsschema entworfen:



PH: intaktes Makromolekel, $\text{P}\cdot$: Makroradikal, $\text{PO}_2\cdot$: Peroxylradikal, $\text{PO}\cdot$: Oxylradikal, F_1 und $\text{F}_2\cdot$: Makromolekülfragment und Fragmentradikal.

Unter Stickstoff beträgt der Sauerstoffgehalt nur $6 \cdot 10^{-6}$ M. Nach 0,2 Gy ist dieser Sauerstoff verbraucht. Ein Mechanismus wie der beschriebene ist daher nicht möglich, dennoch kommt es zu einem starken Zerfall. Es wurde von v. Sonntag und Schulte-Frohlinde gezeigt, daß es zum Kettenbruch in der DNA ohne Gegenwart von Sauerstoff kommen kann. Dieser Prozeß wird ausgelöst durch H-Abstraktion von der 4'-Position der Desoxyribose durch $\text{OH}\cdot$ - oder $\text{H}\cdot$ -Radikale, wobei es zum Bruch zwischen Phosphat und Zucker kommt.

Bei Bestrahlungen unter N_2O schließlich sind weder Sauerstoffmoleküle noch solvatisierte Elektronen in Lösung, aber die $\text{OH}\cdot$ -Radikale sind etwa verdoppelt. Wie von Ward (1975) gezeigt wurde, reagieren nur 10 bis 20 % der $\text{OH}\cdot$ -Radikale mit der Hauptkette der DNA, während der überwiegende Teil der $\text{OH}\cdot$ -Radikale mit den Basen reagiert. Da die Konzentration der $\text{OH}\cdot$ -Radikale verdoppelt ist, gibt es sehr viel mehr Radikalstellen, vor allem an den Basen, so daß Quervernetzungen sehr viel wahrscheinlicher sind. Washino und Schnabel (1982) können auch mit Hilfe der Lichtstreuung bei der Pulsradiolyse zeigen, daß es unter N_2O zur Quervernetzung kommt, allerdings hängt dieser Prozeß stark von der Ionenstärke und von der Dosis ab.

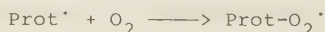
Es kommt daher oft gar nicht zum Bruch, sondern möglicherweise häufiger zu Quervernetzungen; teilweise lagern sich auch Bruchstücke über nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammen. Auf diese Weise lassen sich vielleicht die größeren Fragmen-

te und die in verstärktem Maß auftretenden nicht-kovalenten Bindungen erklären.

Die Frage, welche Radikale den DNA-Abbau bewirken, läßt sich also nicht so einfach beantworten. Zwar konnten Washino und Schnabel (1982) wie auch Schüßler (1983) feststellen, daß der Abbau der DNA nach Abfangen der OH'-Radikale weitgehend ausbleibt, doch zeigen die vorausgehenden Erörterungen, daß die OH'-Radikale wohl nur die Anfangsreaktion zum Kettenbruch bewirken, auf die weitere Reaktionen folgen, die schließlich zum Kettenbruch führen.

4.3.2 Zur Radiolyse des RSA

Das Verhalten des Albumins wurde, wie erwähnt, unter denselben Versuchsbedingungen, die auch in dieser Arbeit zur Anwendung kamen, von Leithner (1983) untersucht. Dabei kam er zu folgenden Ergebnissen: Unter rein oxidierenden Bedingungen in Gegenwart von Luftsauerstoff kam es mit ansteigender Dosis zu einer zunehmenden Veränderung der Molekülstruktur, die zu einer Verbreiterung der Peaks führte. Es handelte sich dabei wohl um Peptidkettenbrüche und dadurch bedingte Molekülfaltungen und Fragmentbildungen. Die strahleninduzierte Fragmentbildung von RSA unter aeroben Bedingungen wurde von Schilling (1983) mit Hilfe der Gelelektrophorese nachgewiesen. Nach Aufhebung der nicht-kovalenten Bindungen mit SDS und nach Reduktion der Disulfidbrücken verstärkten sich die Effekte deutlich. Als Reaktionsmechanismus wurde angenommen, daß die OH'-Radikale durch Entreißen von H-Atomen Proteinradikale erzeugen, die dann nach folgender Gleichung mit Sauerstoff reagieren:



Zur Bruchstückbildung kommt es dann nach Makada und Garrison (1972) durch eine Disproportionierungsreaktion des Protein-peroxyradikals.

Unter anaeroben Bedingungen wurde mit steigender Dosis eine zunehmende Aggregation der Proteinmoleküle registriert, Bruchstücke wurden kaum gefunden. Die entstandenen intermolekularen Bindungen waren überwiegend kovalenter Natur. Die nach Inkubation mit SDS aufgetretenen Entfaltungsvorgänge ließen die Aggregate größer erscheinen als zuvor. Selbst die Reduktion der S-S-Brücken führte nur in beschränktem Maß zum Zerfall der Aggregate, das heißt, daß diese Aggregate über intermolekulare kovalente Bindungen verknüpft sind und die nur zu einem geringen Teil aus S-S-Brücken bestehen. Es wurde folgender Reaktionsmechanismus angegeben:



Auch im Verlauf dieser Arbeit wurde ein Bestrahlungsversuch mit reinem RSA unter Stickstoff wiederholt, um zu sehen, in welchen Fraktionen bei Sepharose CL-2B Aggregate eluiert werden. Dabei ergab sich, daß nach einer Dosis von 1760 Gy etwa ein Drittel des Proteins deutlich größere Einheiten ausbildete, die aber bei weitem nicht so früh eluiert wurden, wie an DNA gebundenes Protein.

Unter Lachgas erhielt Leithner weitgehend dieselben Ergebnisse wie unter Stickstoff. Nur war die sterische Vergrößerung der Aggregate durch SDS geringer und erbrachte die Reduktion der Disulfidbrücken keine Bruchstücke.

4.3.3 Zur gemeinsamen Radiolyse von DNA und RSA

4.3.3.1 Zu Nachweis und Art der DNA-RSA-Bindungen

Schon 1959 beschrieb Butler die Schwierigkeit, DNA nach Bestrahlung von Nukleoprotein vollständig vom Protein zu trennen. Smith (1962) registrierte, daß nach Bestrahlung von *E. coli* mit einer Dosis von 10 Gy der Verlust an mit Phenol extrahierbarer DNA 5 % war, d.h. 5 % der DNA war so stark an Protein gebunden, daß sie sich mit Phenol nicht trennen ließ. Seit 1967 führten auch russische Forscher ähnliche Untersuchungen durch. Sklobowskaya und Ryabschenko beobachteten eine mit steigender Dosis abnehmende Extrahierbarkeit der DNA aus Desoxyribonukleoprotein des Kalbsthymus. Nach Behandlung mit Trypsin (1970 a) war sie wieder extrahierbar. Außerdem fanden sie eine Abhängigkeit der Extrahierbarkeit von der Proteinmenge im künstlichen Komplex (1970 b), wobei die DNA-Histon-Komplexe mit Hilfe der Gelfiltration analysiert wurden. Differenziertere Untersuchungen zeigten auch, daß die verringerte Extrahierbarkeit hauptsächlich von der Bestrahlung der DNA abhing. Strazhevskaya et al. (1971) sahen in der strahlenbedingten Zerstörung der DNA-Struktur eine Vorbedingung für die Ausbildung verstärkter DNA-Protein-Bindungen. Sie stellten eine höhere Bindungsrate saurer gegenüber basischen Proteinen fest, wobei sie nicht-kovalente Bindungen vermuteten, da dieselben nicht SDS-beständig waren. Minsky und Braun (1977) führten an dem gleichen in vitro-System wie in dieser Arbeit Bestrahlungsversuche durch, wobei die Proben mit Hilfe proteinbindender Filter untersucht wurden. Sie fanden für die Bindung von RSA an DNA einen schnellen und einen langsamen Reaktionstyp. Die Bindungen waren durch hohe Salzkonzentrationen nicht zu lösen, was eher für den kovalenten Charakter spricht. Unter Einwirkung von SDS kam es zur Ablösung der DNA, wobei aber nicht untersucht wurde, ob sich die DNA vom Protein oder der gesamte Komplex vom Filter ablöste. Mee und Adelstein (1979)

waren der Meinung, daß die in bestrahltem Chromatin gefundenen Bindungen kovalenter Art sind, da sie auch einem hohen pH-Wert und hohen Salzkonzentrationen widerstanden.

Bei den eigenen Versuchen ließen sich Bindungen zwischen DNA und RSA nur dort mit Sicherheit annehmen, wo Protein in Fraktionen zu finden war, in denen selbst große Proteinaggregate nie vorkommen könnten. Nur unter Stickstoff und unter Lachgas konnte RSA in den Fraktionen 60 bis 110 signifikant nachgewiesen werden, weshalb nur unter diesen Bedingungen das Auftreten von DNA-RSA-Bindungen als gesichert gelten kann. Ob dabei unter N_2 oder unter N_2O mehr Protein an die DNA gebunden wurde, läßt sich schwer abschätzen, da die DNA unter N_2O wesentlich schneller abgebaut wird als unter N_2 . Ein Vergleich mit den in Gegenwart von SDS aufgetrennten Proben zeigt, daß die Bindungen hauptsächlich kovalenter Art sind. Der Abbau der DNA in Gegenwart von RSA ging am schnellsten unter Sauerstoff und am langsamsten unter Stickstoff. Man kann also in Gegenwart von RSA einen Sauerstoffeffekt für den Abbau der DNA nachweisen. Im Vergleich zu den Versuchen ohne RSA hat das Protein eine deutliche Schutzfunktion.

4.3.3.2 Zum Bindungsmechanismus

Bei der Untersuchung der strahleninduzierten Reaktionen zwischen Protein und Nukleinsäure, die zur Quervernetzung führen, stellt sich zunächst die Frage, welche Bausteine des einen Partners bevorzugt mit welchen des anderen reagieren. Dazu untersuchte Yamamoto (1973 a) mit Hilfe der Papierchromatographie das Bindungsverhalten von spezifischen Aminosäuren und Nukleinsäurebasen nach γ -Bestrahlung in wäßriger Lösung. Es zeigte sich dabei, daß die Neigung der Basen, miteinander Bindungen einzugehen, geringer ist als mit bestimmten Aminosäuren. Ein Vergleich der Ausbeute verschiedener gebundener

Nukleinsäurebestandteile an Albumin legte die Vermutung nahe, daß die Basen der Bindungsort am Nukleinsäuremolekül sind. Die Ausbeuten der Pyrimidinbasen waren dabei höher als die der Purinbasen, die der entsprechenden Nukleoside und Nukleotide etwas geringer als die der Basen. Ribose und Ribosephosphat verbanden sich nur in sehr geringem Maß mit Albumin. Von seiten des Proteins nimmt Yamamoto (1976) an, daß zur Entstehung kovalenter DNA-Protein-Bindungen den Thiyl-Radikalen aus schwefelhaltigen Aminosäureresten und den Radikalen vom Phenyl-Typ aus aromatischen Aminosäureresten besondere Bedeutung zukommt.

Damit ist ein weiterer wichtiger Fragenkomplex angeschnitten, nämlich der nach den Radikalreaktionen: Welche Primärradikale greifen hauptsächlich an welchen Substanzen an? Was für Radikalfolgereaktionen können zu den beobachteten Effekten führen? Obgleich es zur Zeit wohl überhaupt noch nicht möglich ist, diesen Fragenkomplex im Detail zufriedenstellend zu beantworten, sollen dennoch hier einige Gedanken zu dieser Problematik mit Bezug zur eigenen Arbeit vorgetragen werden. Dazu ist es hilfreich, sich zunächst einige Fakten zu vergegenwärtigen. Die Molarität der während des Bestrahlungsvorgangs ständig vorhandenen Primärradikale war mit einer Größenordnung von 10^{-8} M gegenüber der des RSA ($1,5 \cdot 10^{-5}$ M) und der der Nukleotide ($3 \cdot 10^{-4}$ M) ziemlich gering. Für die Reaktionen der Radikale mit den Modellsubstanzen gelten folgende Geschwindigkeitskonstanten:

$$k_{(e^-_{aq} + \text{RSA})} = 6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (\text{Schüßler, Davies 1983})$$

$$k_{(e^-_{aq} + \text{DNA})} = 4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (\text{Verberne, 1981})$$

$$k_{(\text{OH}^\bullet + \text{DNA})} = 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (\text{Michaels und Hunt 1973})$$

$$k_{(\text{H}^\bullet + \text{DNA})} = 8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (\text{Scholes and Simic 1968})$$

Die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion der $\text{OH}^\bullet$ -Radikale mit RSA bei pH 7 wurde von Schüßler (1983) pulsradioly-

tisch in einer kompetierenden Reaktion mit KSCN als $k = 5,1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt.

Aus dieser kurzen Aufstellung lassen sich zwei wichtige Aussagen ableiten: Das $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikal reagiert mit den Modells-substanzen schneller als das Elektron; die Reaktionsgeschwindigkeiten der Wasserradikale mit dem Protein sind größer als die mit der DNA. Wenn man dazu noch die Tatsache berücksichtigt, daß das Protein bei diesen Versuchen im zehnfachen Gewichtsüberschuß vorlag, so muß davon ausgegangen werden, daß der erste bedeutende Reaktionsschritt zwischen dem $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikal und dem RSA-Molekül stattfand. Mit Hilfe der Gleichung für kompetierende Reaktion (Henglein, 1969) läßt sich für unsere Versuchsbedingungen berechnen, wieviele der Primärradikale mit der DNA reagieren können:

$$W_{\text{OH}^{\bullet} + \text{DNA}} = \frac{5 \cdot 10^8 \cdot 3 \cdot 10^{-4}}{5 \cdot 10^8 \cdot 3 \cdot 10^{-4} + 5,1 \cdot 10^{10} \cdot 1,5 \cdot 10^{-5}} = 0,16 \quad (17)$$

Das bedeutet, daß 16 % der $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikale noch mit der DNA reagieren. 84 % der $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikale werden mit dem Protein reagieren.

Für die hydratisierten Elektronen findet man nach folgender Gleichung, daß 12 % dieser Primärradikale mit DNA reagieren können:

$$W_{e^{-} + \text{DNA}} = \frac{4 \cdot 10^7 \cdot 3 \cdot 10^{-4}}{4 \cdot 10^7 \cdot 3 \cdot 10^{-4} + 6 \cdot 10^9 \cdot 1,5 \cdot 10^{-5}} = 0,12 \quad (18)$$

Mee und Adelstein (1979) halten das $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikal für am wirksamsten bei der Entstehung von DNA-Protein-Bindungen, weil

sie unter N_2O die höchste Bindungsrate fanden. Auch Yamamoto (1973 a) glaubt, daß das $OH^\bullet$ -Radikal und nicht das Elektron für die Entstehung von Bindungen maßgeblich ist. Wenn man annimmt, daß die Primärradikale unter den gegebenen Bedingungen weitgehend mit dem Protein reagieren, dann müssen Veränderungen an den Nukleinsäureketten hauptsächlich durch dabei entstandene Proteinradikale verursacht sein.

Es drängt sich nun aber die Frage auf, wo in der Reaktionskette (Primärradikal-Protein-Nukleinsäure) die unterschiedlichen Gasbedingungen auf das Reaktionsgeschehen Einfluß nehmen. Unter Stickstoff ist der Schutzeffekt des Proteins für den Abbau der DNA am stärksten ausgeprägt und es wird relativ viel Protein an die DNA gebunden. Alle 3 Primärradikale sind vorhanden. Das $OH^\bullet$ -Radikal reagiert besonders schnell mit den aromatischen Aminosäureseitenketten (Dorfmann und Adams 1973) am RSA-Molekül, aber auch mit den schwefelhaltigen Aminosäuren. Mit Cystin und Cystein reagiert auch das solvatisierte Elektron sehr schnell (Braams 1966). Bei diesen Reaktionen entstehen Radikale vom Phenyl-Typ und Thiylradikale. Diese sind aber, wie bereits erwähnt, nach Yamamoto (1976) entscheidend beteiligt an der Entstehung kovalenter DNA-Protein-Bindungen.

Unter Luft ist die DNA im Vergleich zu den anderen Gasbedingungen durch das Protein am wenigsten geschützt. Quervernetzungen von Protein an DNA konnten nicht nachgewiesen werden. Das Elektron und das $H^\bullet$ -Radikal werden durch den Sauerstoff zu $O_2^{\bullet -}$ bzw. $HO_2^\bullet$ umgesetzt. Um die Reaktion des $OH^\bullet$ -Radikals und des Sauerstoffs mit dem Protein zu verstehen, kann das Reaktionsschema von Denk und Schnabel (1982) (siehe Abschnitt 4.3.1) zu Hilfe genommen werden. Demnach reagieren zuerst die $OH^\bullet$ -Radikale mit den RSA-Molekülen und bilden Proteinradikale. Statt wie unter anaeroben Bedingungen mit der DNA weiterzureagieren, bilden diese mit Sauerstoff Proteinperoxyradikale.

Diese können dann wahrscheinlich an der DNA Radikalstellen erzeugen, ohne sich mit dem DNA-Strang zu verbinden. Diese Radikalstellen reagieren dann möglicherweise wieder mit Sauerstoff und führen über eine Disproportionierungsreaktion zum Kettenbruch. An jedem Bruchstück kann sich dieser Vorgang wiederholen, wobei immer kleinere Fragmente entstehen.

Unter N_2O schließlich liegen wieder anaerobe Bedingungen vor. Die solvatisierten Elektronen werden zu $OH^\bullet$ -Radikalen umgewandelt, wodurch sich diese verdoppeln. Es treten zahlreiche Bindungen zwischen Protein und DNA auf. Dabei kann ein ähnlicher Mechanismus angenommen werden wie der für Stickstoff beschriebene; nur mit dem Unterschied, daß die bindenden Radikalstellen fast ausschließlich von $OH^\bullet$ -Radikalen herühren. Der wichtigste Unterschied zu den Versuchen unter Stickstoff besteht aber darin, daß der Schutzeffekt des RSA für den Abbau der Nukleinsäure wesentlich geringer ausfällt.

Um die unterschiedliche Stärke dieses Schutzeffektes besser verstehen zu können, voraus einige Bemerkungen zum Zustandekommen dieses Phänomens an sich. In Gegenwart von RSA reagiert bei dem gegebenen Mengenverhältnis, wie gesagt, der überwiegende Teil der Primärradikale zunächst mit dem Protein. Die dabei entstehenden Radikalstellen an den Albuminmolekülen greifen aber bei weitem nicht alle an den Nukleinsäureketten an, sondern reagieren auch intra- und intermolekular mit RSA-Molekülen weiter und führen zu den in Abschnitt 4.3.2 besprochenen Veränderungen des Proteins wie Denaturierung und Aggregation. Es ist insbesondere der Umstand zu berücksichtigen, daß eine Radikalstelle an einem RSA-Molekül oder gar an einem Aggregat ein wesentlich geringeres Diffusionsvermögen besitzt wie ein Primärradikal. Das bedeutet eine geringere Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens mit einem DNA-Makromolekül. Die Zahl der Brüche wird kleiner und die Größe der Bruchstücke nimmt zu (Washino, Denk und Schnabel 1983). Unter Stickstoff ist der Schutz gegen den Abbau

des DNA-Moleküls wohl deshalb am größten, weil ein großer Teil der Wechselwirkungen der Proteinradikale mit den Nukleinsäurebasen stattfindet, wobei Bindungen, aber keine Brüche an den DNA-Molekülen zustandekommen. Die 16 % der $\text{OH}^\bullet$ -Radikale, die nicht durch RSA abgefangen werden und von denen nur etwa 2 % zur Entstehung von Brüchen beitragen, und diejenigen Proteinradikale, welche die Desoxyribose angreifen, fallen hier nicht so sehr ins Gewicht. Unter Luftsauerstoff dagegen bewirken die strahlenchemischen Vorgänge bevorzugt den Abbau der DNA. Dabei spielen, wie beschrieben, besonders die Proteinperoxyradikale eine wichtige Rolle. Unter N_2O schließlich ist der Schutzeffekt wohl deshalb geringer als unter N_2 , weil bei der doppelten Menge an $\text{OH}^\bullet$ -Radikalen sich auch die Zahl der $\text{OH}^\bullet$ -Radikale verdoppelt, die nicht mit dem RSA, sondern direkt mit der DNA reagieren und diese wie in Abwesenheit von Protein abbauen.

5. Zusammenfassung

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) gilt seit langem als Target der Zellinaktivierung durch ionisierende Strahlen. In der Zelle liegt sie nicht isoliert, sondern in enger Nachbarschaft mit anderen Biomolekülen, besonders Proteinen vor. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag leisten, die durch Röntgenstrahlen bedingten Veränderungen an Nukleinsäure und Protein in wäßriger Lösung besser kennen und verstehen zu lernen. Gleichzeitig soll die Eignung weitporiger Agarosegele für derartige Untersuchungen getestet werden.

Die Untersuchungen wurden an dem einfachen Modell DNA-Rinder-serumalbumin durchgeführt. Die beiden Stoffe wurden im Verhältnis 1 : 10, das etwa dem natürlichen Verhältnis von Nukleinsäure : Protein in der Zelle entspricht, in 10^{-2} M Natriumphosphatpuffer pH 7 gelöst. Die Bestrahlung der Proben erfolgte unter Luft, Stickstoff und Lachgas mit unterschiedlichen Dosen bis zu 1760 Gy. Die Proben wurden über dem Gel Sepharose CL-2B mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Natriumphosphatpuffer pH 7 mit und ohne Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgetrennt. Die Fraktionen wurden bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch ausgemessen. Der Proteinanteil wurde nach zwei verschiedenen kolorimetrischen Verfahren bestimmt, bei denen vorher in Eichversuchen der lineare Bereich überprüft wurde. Um den Einfluß des Proteins auf die Strahlensensibilität der DNA untersuchen zu können, wurden auch Proben ohne RSA unter den verschiedenen Gasbedingungen mit 440 Gy bestrahlt. Durch Inkubation der bestrahlten Proben mit SDS sowie Auftrennung in Gegenwart von SDS ließen sich die zwischen DNA und RSA entstandenen kovalenten Bindungen bestimmen, während nach Gel-filtration ohne SDS auch nicht-kovalente Bindungen erhalten blieben.

Die Gelchromatogramme der nativen Proben ergaben eine deutliche Trennung von DNA und Protein, ohne daß irgendwelche Wechselwirkungen auftraten. Bei Bestrahlung ohne Protein kam es sehr rasch zum Abbau der DNA, welcher unter N_2O geringer war als unter Stickstoff und Luft. Bei Bestrahlung von DNA und RSA unter Luftsauerstoff zerfielen die Nukleinsäureketten nach relativ niedrigen Dosen zu kleinen Bruchstücken. Bindungen von Protein an DNA konnten nicht nachgewiesen werden. Unter Stickstoff dagegen war der Abbau der DNA wesentlich geringer. Es traten Quervernetzungen zwischen den beiden Komponenten auf, die überwiegend kovalenter Art waren. Unter N_2O kam es bei nicht unerheblichem Abbau der DNA-Moleküle ebenfalls zu meist kovalenten Bindungen an RSA. Das Protein bewirkte in jedem Fall einen Strahlenschutz für den Abbau der DNA. Während ohne RSA der strahleninduzierte Abbau der DNA durch O_2 nicht verstärkt wird, wurde in Gegenwart von Protein für diese Reaktion ein eindeutiger Sauerstoffeffekt gefunden.

6. Literaturverzeichnis

- BOHNE, L., Th. COQUERELLE, U. HAGEN (1970): Int. J. Radiat. Biol., Vol. 17, No. 3, 205-215.
- BRAAMS, R. (1966): Radiat. Res. 27, 319.
- BUDDECKE, E. (1977): Grundriß der Biochemie, 5. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin.
- BUTLER, J.A.V. (1959): Radiat. Res. Suppl. 1, 403-416.
- DALE, W.M. (1942): Biochem. J. 36, 80.
- DALE, W.M. (1947): Brit. J. Radiol. Suppl. 1, 46.
- DALE, W.M., L.H. GRAY, W.J. MEREDITH (1949): Phil. Trans. Roy Soc. London, Ser. A 242, 33.
- DALE, W.M. (1954): Rad. Biol. 1, 255.
- DENK, O., W. SCHNABEL (1982): Z. Naturforsch. 37 c, 405-412.
- DETINGER, H., H. JUNG (1969): Molekulare Strahlenbiologie. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- DORFMANN, L.M., G.E. ADAMS (1973): NSRDS-NBS 46.
- DRAGANIC, J.G., Z.D. DRAGANIC (1971): The Radiation Chemistry of Water. Physical. Chemistry Series Monographs Vol. 26, Academic Press, New York.
- FISH, W.W., J.A. REYNOLDS, C. TANFORD (1970): J. Biol. Chem. 245, 5166.
- FRICKE, H., B.W. PETERSEN (1927): Strahlentherapie 26, 329.
- GLASSER, O. (1931): Wilhelm Conrad Röntgen und die Geschichte der Röntgen-Strahlen. Berlin.
- GRIFFITH, J.P. (1972): Biochem. 126, 553-556.
- HAGEN, U. (1967): Biochem. Biophys. Acta 134, 45.
- HAGEN, U. (1968): Z. Naturforsch. 236, 1176-1183.
- HAGEN, u. (1973): Biophysik 9, 279-289.
- HART, E.J., J.W. BOAG, J. AMER (1962): Chem. Soc. 84, 4090.

- HENGLEIN, A., W. SCHNABEL, J. WENDENBURG (1969): Einführung in die Strahlenchemie, Verlag Chemie GmbH, Weinheim.
- HOLLAENDER, A., G.E. STAPLETON, F.L. MARTIN (1951): Nature 167, 103.
- HÜTTERMANN, J., W. KÖHNLEIN, R. TÉOULE (1978): Effects of Ionizing Radiation on DNA. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- JUNGERMANN, K., H. MÖHLER (1980): Biochemie. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- KAPLAN, H.S., L.E. MOSES (1964): Science 145, 21-25.
- KEENE, J.P. (1963): Nature, London 197, 47.
- KUNIGK, K. (1971): Dissertation, Erlangen.
- LEITHNER, L.H. (1983): Dissertation, Erlangen.
- LETT, J.T., K.A. STACEY, P. ALEXANDER (1961): Radiat. Res. 14, 349-362.
- MAKADA, H.A., W.M. GARRISON (1972): Radiat. Res. 50, 48.
- MEE, L.K., S.J. ADELSTEIN (1979): Int. J. Radiat. Biol. Vol. 36, 359-366.
- MEE, L.K., S.J. ADELSTEIN (1981): Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78, 2194-2198.
- MICHAELS, H.B., J.W. HUNT (1973): Radiat. Res. 56, 57.
- MINSKY, B.D., H. BRAUN (1977): Radiat. Res. 71, 505-515.
- MORRIS, C.J.O.R., P. MORRIS (1976): Separation Methods in Biochemistry, 2nd Ed., Pitman Publishing, London.
- PETERSON, G.L. (1979): Analyt. Biochem. 100, 201.
- PHARMACIA FINE CHEMICALS (1980): Sepharose CL, For gelfiltration and affinity chromatography. Firmenschrift, Uppsala.
- ROSENOER, V.M., M. ORATZ, M.A. ROTHSCCHILD (1977): Albumin Structure, Function and Uses. Pergamon Press, Oxford-New York-Toronto-Paris-Sydney-Frankfurt.
- SCHILLING, K. (1984): Dissertation, Erlangen.

- SCHOLES, G., M. SIMIC (1968): Biochem. Biophys. Acta 166, 255.
- SCHÜSSLER, H. (1976): Habilitationsschrift, Erlangen.
- SCHÜSSLER, H. (1982): private Mitteilung.
- SCHÜSSLER, H. (1983): Vortrag, Mühlheim.
- SCHÜSSLER, H. (1983): private Mitteilung über Messungen in Bonnel University.
- SCHÜSSLER, H., J.V. DAWIES (1983): Int. J. Radiat. Biol. 43, 291-301.
- SEDMAN, J.J., S.E. GROSSBERG (1977): Anal. Biochem. 79, 544-552.
- SKLOBOVSKAYA, M.V., N.I. RYABCHENKO (1970 a): Radiobiologiya 10, 14-18.
- SKLOBOVSKAYA, M.V., N.I. RYABCHENKO (1970 b): Radiobiologiya 10, 332-337.
- SMITH, K.C. (1962): Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 157-163.
- SOLDNER, L.H.K. (1981): Dissertation, Erlangen.
- STRAZHEVSKAYA, N.B., M. L. TROYANOVSKAYA, G.G. KRIVTSOV (1971): Radiobiologiya 11, 329-334.
- VERBERNE, J.B. (1981): Dissertation, Amsterdam.
- von SONNTAG, C., SCHULTE-FROHLINDE, D., in "Effects of Ionizing Radiation on DNA" herausgegeben von A.J. Bertinchamps, Springer-Verlag Berlin 1978.
- WANG, Ch.S., R.L. SMITH (1975): Anal. Biochem. 63, 414-417.
- WARD, J.F. (1975): Adv. Radiat. Biol. 5, 181-239.
- WARD, J.F., J. KUO (1978): Radiat. Res. 75, 278-285.
- WASHINO, K., O. DENK, W. SCHNABEL (1983): Z. Naturforsch. 38 c, 100-106.
- WASHINO, K., W. SCHNABEL (1982): Makromol. Chemie 183, 697-709.
- WEBER, K., M. OSBRON in: NEURATH, H. et al. (Editors) (1975): The Proteins. New York, San Francisco.

YAMAMOTO, O. (1973 a): Int. J. Radiat. Phys. Chem. 5,
213-229.

YAMAMOTO, O. (1976): in: SMITH, K.C., ed. Aging carcinogenesis and radiation biology. Plenum Press, New York, 165-187.

ZAHN, Th. (1976): Dissertation, Erlangen.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Pauly danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige materielle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. H. Schüßler, unter deren wissenschaftlicher Anleitung diese Arbeit entstanden ist. Frau Dr. Schüßler hat durch ihren fachkundigen, stets hilfsbereiten und ermutigenden Rat viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch Frau A. Friedrich, Frl. H. Hartmann und Herrn Dipl. Ing. P. Hutmann für die Einarbeitung in die experimentelle Methodik und für die Hilfe beim Anfertigen der Zeichnungen.

L e b e n s l a u f

Am 17. Oktober 1956 wurde ich, Albert Maria Geiger, als Sohn des städtischen Brandmeisters Albert Franz Geiger und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Zacherl, zu München geboren.

Von 1963 bis 1967 besuchte ich die Volksschule in München und trat dann auf das Wittelsbacher Gymnasium über. Mit der neunten Klasse wechselte ich vom humanistischen auf den neusprachlichen Zweig, den ich 1976 mit dem Abitur abschloß.

Im Wintersemester 1976 war ich an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München in den Fächern Deutsch und Katholische Religion für das Lehramt an Gymnasien immatrikuliert. Im Sommersemester 1977 nahm ich an der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen das Studium der Zahnheilkunde auf, das ich im Wintersemester 1982 mit dem Staatsexamen beendete.

